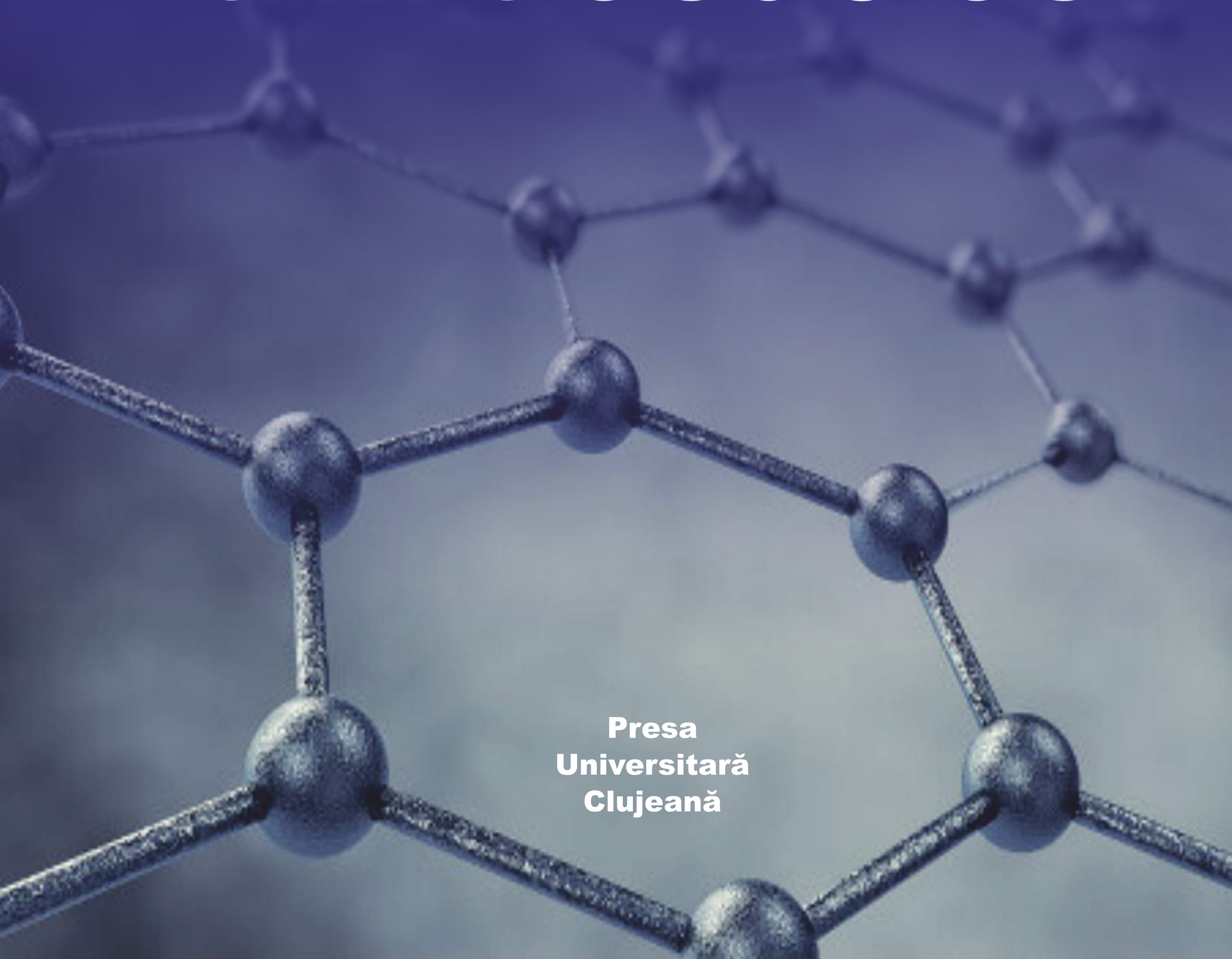
Anca Farkas

Biotehnologii farmaceutice



Presa
Universitară
Clujeană

ANCA FARKAS

BIOTEHNOLOGII FARMACEUTICE

ANCA FARKAS

BIOTEHNOLOGII FARMACEUTICE

PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ

2021

Referenţi ştiinţifici:

Conf. dr. habil. Anca Butiuc

Conf. dr. Vasile Muntean

Șef lucrări dr. Carmen Elena Pop

ISBN 978-606-37-1276-0

Universitatea Babeş-Bolyai
Presa Universitară Clujeană
Director: Codruţa Săcelean
Str. Hasdeu nr. 51
400371 Cluj-Napoca, România
Tel./fax: (+40)-264-597.401
E-mail: editura@ubbcluj.ro
http://www.editura.ubbcluj.ro/

CUPRINS

Lista de abrevieri şi acronime 9

1. NOŢIUNI INTRODUCTIVE 13
1.1. Scurt istoric al medicamentelor şi industriei farmaceutice 13
1.2. Industria farmaceutică din România 15
1.3. Drepturi de proprietate intelectuală pentru preparatele utilizate în medicina tradiţională.. 16
1.4. Momente remarcabile.. 18
1.5. Medicamente şi preparate medicamentoase 20
1.6. Produse biofarmaceutice 24

2. NOŢIUNI DE TEHNOLOGIE FARMACEUTICĂ. EVALUAREA BIOFARMACEUTICĂ 25
2.1. Realizarea medicamentelor 25
2.2. Obţinerea acţiunii terapeutice.. 32
2.3. Biodisponibilitate, bioechivalenţă şi biosuperioritate 33

3. CONCEPŢIA ŞI DEZVOLTAREA NOILOR MEDICAMENTE.................................... 36
3.1. Etapele cercetării şi devoltării medicamentelor 36
3.2. Reglemetări legale.. 45
3.3. Medicamente biosimilare 47
3.4. Medicamente orfane.. 48
3.5. Rentabilizarea dezvoltării de noi medicamente.. 49

4. BIOPROCESE CU IMPLICAŢII ÎN INDUSTRIA FARMACEUTICĂ........................... 52
4.1. Etapele biosintezei.. 54
4.2. Bioprocese de fermentaţie 56
4.3. Separarea produşilor obţinuţi prin biosinteză.. 62
4.4. Criterii de evaluare a proceselor biotehnologice... 65

5. BIOTEHNOLOGIA OBŢINERII ANTIBIOTICELOR 66
5.1. Chimioterapia şi antibioticele citotoxice.. 70
5.2. Antibioticele beta-lactamice... 72
5.2.1. Penicilinele.. 73
5.2.2. Obţinerea penicilinelor semisintetice... 77
5.2.3. Cefalosporinele 79
5.2.4. Obţinerea cefalosporinelor semisintetice.. 81
5.3. Antibioticele aminoglicozidice 84
5.3.1. Streptomicina 85
5.3.2. Gentamicina 88
5.3.3. Kanamicina 89

5.3.4. Tobramicina ... 89
5.3.5. Neomicina ... 90
5.3.6. Paromomicina ... 90
5.3.7. Obţinerea aminoglicozidelor semisintetice ... 90
5.4. Antibioticele glicopeptidice ... 91
5.5. Tetraciclinele ... 93
5.6. Macrolidele ... 96
5.6.1. Eritromicina ... 98
5.6.2. Macrolidele semisintetice ... 99
5.6.3. Tiacumicinele ... 101
5.7. Lincosamidele ... 102
5.8. Streptograminele ... 103
5.9. Pleuromutilinele ... 105
5.10. Alte antibiotice obţinute prin biotehnologii ... 106
5.11. Antibiotice obţinute prin sinteză chimică ... 113
5.12. Rezistenţa bacteriană la acţiunea antibioticelor ... 114
5.13. Necesitatea de noi antibiotice ... 117
5.14. Cele mai noi antibiotice ... 120

6. ALŢI AGENŢI ANTIINFECŢIOŞI ŞI ANTIPARAZITARI PRODUŞI PRIN BIOSINTEZĂ ... 122
6.1. Polienele ... 122
6.2. Avermectinele ... 123
6.3. Artemisinina ... 125

7. ALTE MEDICAMENTE PRODUSE PRIN BIOTEHNOLOGII DE FERMENTAŢIE ... 127
7.1. Macrolide cu activitate imunosupresivă ... 127
7.2. Agenţi antihiperlipidemici şi antiarteriosclerotici ... 128
7.3. Vitamine ... 130
7.3.1. Biotehnologia obţinerii riboflavinei (vitamina B2) ... 132
7.3.2. Biotehnologia obţinerii cobalaminei (vitamina B12) ... 134

8. BIOTEHNOLOGII PENTRU OBŢINEREA VACCINURILOR ... 138
8.1. Principiul de acţiune al vaccinurilor ... 142
8.1.1. Bazele imunologice ale vaccinării ... 143
8.1.2. Antigenele ... 147
8.1.3. Antigenitatea şi imunogenitatea ... 148
8.2. Tipuri de vaccinuri ... 151
8.2.1. Vaccinuri vii atenuate ... 152
8.2.2. Vaccinuri inactivate ... 153
8.2.3. Vaccinuri subunitare ... 153
8.2.4. Vaccinuri cu vectori virali recombinaţi ... 155
8.2.5. Vaccinuri cu acizi nucleici ... 158
8.2.6. Vaccinuri cu ARNm ... 160
8.2.7. Vaccinologia inversă ... 162

8.2.8. Vaccinologia structurală 162
8.2.9. Vaccinuri cu peptide sintetice 163
8.2.10. Vaccinuri cu celule prezentatoare de antigen 163
8.3. Formularea vaccinurilor 164
8.4. Perspective ale vaccinării 166
8.4.1. Oncovaccinuri 168
8.4.2. Vaccinul antigripal universal 171
8.4.3. Vaccinuri anti-SARS-CoV-2 172
8.5. Seruri 174
9. OBŢINEREA PROTEINELOR RECOMBINATE 176
9.1 Sisteme de exprimare a proteinelor recombinate 177
9.2. Anticorpii monoclonali 180
9.2.1. Tehnologia producerii anticorpilor monoclonali prin metoda hibridomilor 181
9.2.2. Tehnologia producerii anticorpilor monoclonali prin metoda expunerii 182
9.2.3. Construcţia bibliotecilor de anticorpi şi clonarea repertoriului antigenic 182
9.2.4. Expunerea proteinelor recombinate pe suprafaţa bacteriofagilor 183
9.2.5. Expunerea proteinelor recombinate pe suprafaţa celulelor de drojdie 184
9.2.6. Expunerea proteinelor recombinate prin ARNm şi ribosomi 185
9.2.7. Expunerea proteinelor recombinate prin ADN 186
9.2.8. Utilizările anticorpilor monoclonali 186
9.3. Peptidele sistemului imunitar 187
9.3.1. Interferoni 187
9.3.2. Interleukine 191
9.3.3. Factori de necroză tumorală 195
9.3.4. Factori de creştere 196
9.4. Derivaţii din sânge 200
9.4.1. Factori de coagulare a sângelui 200
9.4.2. Medicamente anticoagulante 201
9.4.3. Agenţi trombolitici 203
9.4.4. Alte molecule biofarmaceutice derivate din sânge 204
9.5. Enzimele 206
9.5.1. Enzime cu rol trombolitic 208
9.5.2. Diverse enzime terapeutice 210
9.5.3. Enzime pentru tratarea unor maladii genetice 211
9.5.4. Alte enzime cu importanţă farmaceutică 215
9.5.5. Enzime utile ingineriei genetice şi biologiei moleculare 216
9.6. Hormonii 219
9.6.1. Insulina 220
9.6.2. Glucagonul 223
9.6.3. Hormonul somatotrop hipofizar 224
9.6.4. Gonadotropinele şi gonadosteroizii 225
9.6.5. Hormonul stimulator al tiroidei 230
9.6.6. Parathormonul şi calcitonina 231

9.6.7. Peptidele natriuretice atriale ... 232

10. TERAPII GENETICE ŞI CELULARE ... 233
10.1. Terapia genică ... 233
10.1.1. Vectori utilizaţi în terapia genică ... 234
10.1.2. Tehnologia antisens: oligonucleotide antisens şi aptameri ... 241
10.1.3. ARN interferent şi ribozime ... 243
10.1.4. ARN mesager ... 245
10.1.5. Obţinerea genelor, plasmidelor şi oligonucleotidelor ... 245
10.1.6. Tehnologia CRISPR-Cas ... 246
10.2. Terapii pe bază de celule şi ţesuturi ... 249
10.2.1. Transplantul ... 250
10.2.2. Celulele stem ... 252
10.2.3. Abordări emergente ale medicinei regenerative ... 255
10.2.4. Biofarmaceutice pentru terapii pe bază de celule ... 257
10.2.5. Produse bioterapeutice vii ... 258

11. ABORDĂRI COMPLEXE. TERAPIA ONCOLOGICĂ ... 262

Bibliografie ... 267

Lista de abrevieri şi acronime

6-APA: 6-aminopenicillanic acid
7-ACA: 7-aminocephalosporanic acid
7-ADCA: 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid
ACV: L-α-aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine
ADA-SCID: Adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency
ADC: Antibody-drug compound
ADN: Acid dezoxiribonucleic
ADNdc: ADN dublucatenar
ADNmc: ADN monocatenar
ADME: Absorbţie, distribuţie, metabolizare şi eliminare
ADSOL: Adenine, glucose, mannitol solution
ARN: Acid ribonucleic
ARNdc: ARN dublucatenar
ARNm: ARN mesager
ARNmc: ARN monocatenar
ARNmi: MicroARN
ARNr: ARN ribosomal
ARNsi: ARN interferent mic (small interfering)
ARNt: ARN de transfer
AHP: Acute hepatic porphyry
ALAS1: Aminolevulinic acid synthase 1
ANMDM: Agenţia Naţională a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale
APC: Antigen-presenting cells
ASCVD: Atherosclerotic cardiovascular disease
ATC: Anatomical Therapeutic Chemical classification
ATP: Adenosine triphosphate
BAC: Bacterial artificial chromosome
BCS: Biopharmaceutical classification system
BGH: Bovine growth hormone
BHK: Baby hamster kidney
C1-INH: C1 esterase inhibitor
CAR-T: Chimeric antigen receptor T cells
CFU: Colony forming units
CGRP: Calcitonin gene-related peptide
CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use
CHO: Chinese hamster ovary
CMV: Cytomegalovirus
CNBMDM: Comisia Naţională de Bioetică a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale
CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSF: Colony stimulating factor

CSIF: Cytokine synthesis inhibition factor
DAC: Deacetylcephalosporin C
DAO: Diamine oxidase
DAOC: Deacetoxycephalosporin C
DCI: Denumirea Comună Internaţională
DHPS: Dihydropteroate synthase
DMSO: Dimethyl sulfoxide
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EMA: European Medicines Agency
EPO: Erythropoietin
ESBL: Extended spectrum beta lactamase
F VIII: Factorul VIII al coagulării sângelui
F IX: Factorul IX al coagulării sângelui
FAD: Flavin adenine dinucleotide
FGF: Fibroblasts growth factor
FDA: Food and Drug Administration
FIV: Fertilizarea *in vitro*
FMN: Flavin mononucleotide
FSH: Follicle stimulating hormone
GABA: Gamma-aminobutyric acid
GalNac: N-acetylgalactosamine
GCP: Good Manufacturing Practice
G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor
GLA: Glutaryl acylase
GLP-1: Glucagon-like peptide-1
GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GMP: Good Manufacturing Practice
GPCR: G protein-coupled receptor
GRAS: Generally recognized as safe
GSK: Glaxo Smith Kline
HAT: Hypoxanthine, aminopterin, thymidine
HBV: Hepatitis B virus
HCG: Human chorionic gonadotropin
HCV: Hepatitis C virus
HeFH: Heterozygous familial hypercholesterolemia
HEK: Human embryonic kidney
HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HGF: Hematopoietic growth factor
HGT: Horizontal gene transfer
HIV: Human immunodeficiency virus
HLA: Human leucocyte antigen
HPLC: High-performance liquid chromatography
HPV: Human papillomavirus

HTLV: Human T-lymphotropic virus
HTS: High throughput screening
iARN: Interferenţa ARN
IAV: Influenza A virus
IB: Inclusion bodies
IBV: Influenza B virus
ICH: International Conference of Harmonization of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ICP: Infected cell protein
IFN: Interferon
IGF: Insulin-like growth factor
IL: Interleukin
IPN: Isopenicillin N
iPSC: Induced pluripotent stem cells
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
JAK: Janus kinase
JAK-STAT: Janus-activated kinase-signal transducer and activator of transcription
LAK: Lymphokine activated killer cell
LDL: Low density lipoproteins
LH: Luteinizing hormone
LHRH: Luteinizing hormone releasing factor
LNKS: Lovastatin-nonaketid synthase
LPL: Lipoprotein lipase
LTR: Long terminal repeats
MBL: Metallo-beta-lactamase
MGDF: Megakaryocytes growth and development factor
MenB: *Neisseria meningitidis* type B
MHC: Major histocompatibility complex
MLSB: Macrolide, lincosamide, streptogramin B
MPLA: Monophosphoryl lipid A
MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCBI: National Centre for Biotechnology Information
NEOIMD: Neonatal-onset multisystem inflammatory disease
NGF: Neurotrophin, nerve growth factor
NHGRI: National Human Genome Research Institute
NIH: National Institute of Health
NRM: Non-replicating mRNA
NRPS: Non-ribosomal peptide synthase
ORF: Open reading frame
PCP: Peptidyl-carrier protein
PCR: Polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-derived growth factor

PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor
PEG: Polyethylene glycol
PhLOPS: Phenicol, lincosamide, oxazolidinone, pleuromutilin, streptogramin
PKS: Polyketide synthase
PTK: Protein tyrosine kinase
PQQ: Pyrroloquinoline quinone
PSA: Prostate-specific antigen
RISC: RNA-induced silencing complex
ROR: Rujeolă, oreion, rubeolă
RSV: Respiratory syncytial virus
SAM: Self-amplifying mRNA
SARS-CoV: Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus
SCF: Stem cell factor
SDS: Sodium dodecyl sulphate
SFV: Semliki Forest virus
SV40: Simian vacuolating virus 40
TALEN: Transcription activator-like effector nuclease
TAR: Transformation-associated recombination
TCGF: T cells growth factor
TORCH: Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), Herpes infections
TKDL: Traditional Knowledge Digital Library
TLR: Toll-like receptor
TNF: Tumour necrosis factor
tPA: Tissue plasminogen activator
TPO: Thrombopoietin
TSB: Tryptone soy broth
TSH: Thyroid stimulating hormone
TTR: Transthyretin
UTR: Untranslated region
VBNC: Viable but not cultivable
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor
VLDL: Very low density lipoprotein
VLP: Virus-like particle
VRE: Vancomycin-resistant *Enterococcus*
VRSA: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*
VLV: Virus-like vesicle
VSE: Vancomycin-sensitive *Enterococcus*
VSV: Vesicular stomatitis virus
WHO: World Health Organization
WIPO: World Intellectual Property Organization
ZFN: Zinc finger nuclease

1. NOŢIUNI INTRODUCTIVE

Ştiinţele farmaceutice (gr. *pharmakon* = otravă, medicament) reprezintă un domeniu interdisciplinar ce reuneşte multiple ramuri din medicină, biologie şi biotehnologie, chimie, fizică, inginerie şi informatică, în scopul descoperirii, formulării, preparării, depozitării şi administrării preparatelor medicamentoase. Aceste ştiinţe complexe studiază materiile prime obţinute din surse naturale (farmacognozia), mecanismele de acţiune şi interacţiunea cu organismul (farmacologia), biodisponibilitatea (biofarmacia), eficacitatea (bioechivalenţa), dar şi costurile de producţie ale medicamentelor (farmacoeconomia). Odată ce un compus a fost identificat ca fiind un potenţial candidat, suita de etape care se derulează în scopul cercetării şi dezvoltării noului medicament, prin studii preclinice şi clinice, urmăresc siguranţa şi eficacitatea, dar şi toxicitatea, efectele adverse, interacţiunile medicamentoase. Infrastructura de cercetare, producţie, departamentele conexe ale unei fabrici de medicamente supervizate de autorităţile în domeniu asigură calitatea medicamentelor (prin analize fizice, chimice, microbiologice) şi de asemenea documentează, reglementează, armonizează şi autorizează producerea şi distribuţia medicamentelor definite ca substanţe utilizate pentru profilaxia, tratamentul ori diagnosticarea bolilor.

Farmacocinetica, farmacodinamia, farmacotoxicologia, farmacografia, farmacoterapia, farmacoepidemiologia sunt principalele ramuri ale farmacologiei. Farmacocinetica studiază procesele pe care le suferă substanţa medicamentoasă eliberată dintr-o formă farmaceutică administrată în organism (eliberare, absorbţie, distribuţie, biodisponibilitate, metabolizare, eliminare), în timp ce farmacodinamia descrie răspunsul organismului la nivel biochimic şi molecular. Farmacotoxicologia investighează efectele secundare sau reacţiile adverse produse de medicamente precum şi patologia medicamentelor, iar farmacovigilenţa reprezintă un sistem de monitorizare continuă a reacțiilor adverse ale produselor medicamentoase. Farmacografia stabilește regulile de prescriere a medicamentelor. Farmacoterapia abordează integrat administrarea medicamentelor în scopul profilaxiei, tratării şi diagnosticării anumitor boli. Farmacoepidemiologia se ocupă cu studiul administrării şi al efectelor medicamentelor la nivel de populaţii bine definite, investigând impactul medicamentelor asupra evoluţiei bolilor.

1.1. Scurt istoric al medicamentelor şi industriei farmaceutice

Într-o abordare cronologică, etapele istoriei medicamentelor sunt cea preistorică, filosofică, experimentală şi modernă. Doctoriile au existat dintotdeauna, oamenii căutând leac suferinţelor. În vremurile trecute, vindecătorii apelau la empirism şi rugăciune, învăţături moştenite şi teorii mistice. Tabele sumeriene cu inscripţii cuneiforme, tratate indiene ayurvedice, papirusuri egiptene, manuscrise chinezeşti şi înscrisuri greceşti indică utilizarea substanţelor medicinale încă din preistorie. În antichitate, perioada filosofică şi cea experimentală a istoriei medicamentelor au fost dominate de filosofi şi alchimişti. Medicina tradiţională era bazată pe utilizarea sărurilor minerale, a preparatelor din plante, a ciupercilor, a produselor de origine animală dar şi a unor părţi ale corpului

uman. De la sarea de bucătărie până la săruri toxice de plumb, cupru, fier, mercur, arsen şi litiu şi-au găsit utilizarea în scopuri medicinale şi cosmetice. O vagă diferenţă de dozare făcea diferenţa dintre otravă şi medicament. Paracelsus (1493-1541), părintele toxicologiei, a introdus acest concept: *Dosis facit venenum*.

Diverse preparate erau obţinute din plante, iar principiile active au fost ulterior descoperite, extrase şi exploatate în industria farmaceutică modernă: *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Mandragora officinarum* (atropina), *Cinchona officinalis* (chinina), *Coffea* sp., *Cola acuminata* (cafeina), *Colchicum autumnale* (colchicina), *Digitalis purpurea* (digitalina), *Ephedra* sp. (efedrina), *Erythroxylum* sp. (cocaina), *Glaucium flavum* (glaucina), *Papaver somniferum* (morfina, papaverina, codeina), *Ricinnus communis* (ricina). Ciupercile superioare au fost utilizate în medicina tradiţională chineză (*Ganoderma lucidum*) şi japoneză (*Grifola frondosa*). Poţiunile preparate în ritualurile şamanilor conţineau ciuperci cu proprietăţi halucinogene: *Amanita muscaria*, *Entoloma* sp., *Mycena pura* (muscarina), *Psilocibe* sp. (psilocibina), specii din genurile *Copelandia*, *Galerina*, *Gymnopilus*, *Inocybe*, *Mycena*, *Panaeolus*, *Pholiotina* sau *Pluteus*.

Începuturile farmacologiei ştiinţifice au fost fundamentate prin descoperirea, confirmarea şi izolarea alcaloizilor, ulterior a glicozidelor, taninurilor, saponinelor, uleiurilor eterice, vitaminelor şi hormonilor. Pe lângă cele menţionate mai sus, multe alte specii de plante pe care se bazează terapiile naturiste, demonstrează în continuare utilitatea în medicina holistică, în homeopatie şi medicina naturistă: *Aloe vera*, *Camellia sinensis*, *Chelidonium majus*, *Echinacea purpurea*, *Equisetum arvense*, *Ginkgo biloba*, *Hyoscyamus niger*, *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla*, *Panax gingseng*, *Tilia cordata* şi multe altele. Aromaterapia, componentă a medicinei alternative, foloseşte în scop terapeutic, spiritual, igienic şi ritualic uleiurile esenţiale obţinute din plante aromatice: *Cananga odorata*, *Cinnamomum verum*, *Citrus* sp., *Coriandrum sativum*, *Juniperus* sp, *Laurus nobilis*, *Lavandula angustifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Myrtus communis*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Oreganum vulgare*, *Pelargonium roseum*, *Pinus sylvestris*, *Pogostemon cablin*, *Rosa damascena*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Vanilla planifolia*, *Zingiber officinale* etc.

Termenul *materia medica* introdus de Dioscorides (sec. I e.n.), înglobând noţiunile privind proprietăţile terapeutice ale unei substanţe, a fost utilizat până în secolul XX, când a fost înlocuit prin termenul *farmacologie*. Galenus (sec. II e.n.) a experimentat şi definit prepararea unor reţete prin formulare, iar cunoştinţele lăsate posterităţii îi poartă numele ca formă farmaceutică sau galenică. Separarea farmaciei de medicină a avut loc în secolul XIII, iar prima enciclopedie a farmaceuticelor a fost publicată în anul 1498 la Florenţa. În prezent, **Farmacopeea** reprezintă manualul oficial, cu caracter normativ, folosit în practica farmaceutică. Industria farmaceutică modernă îşi are originea în două surse: spiţeriile care produceau substanţe precum morfina, chinina şi stricnina la mijlocul secolului XIX şi companiile producătoare de chimicale care deţineau laboratoare de cercetare în scopul descoperirii produselor cu aplicaţii medicale, în jurul anilor 1880.

Marile companii farmaceutice de azi au la bază mici afaceri de familie, începute cu două-trei secole în urmă. Istoria companiei Glaxo Smith Kline (GSK) menţionează farmacia Plough Court, înfiinţată în anul 1715 la Londra şi drogheria Smith & Co deschisă în 1830 în Philadelphia. Merck a început în 1654 ca o mică spiţerie în Darmstadt, Germania. B Braun a fost fondată în anul 1839, Schering AG în anul 1851 iar Boehringer Ingelheim în 1885 în Germania, Elli Lilly în anul 1876 iar

Abbott în 1888 în SUA, Hoffmann-La Roche în anul 1896 în Elveţia iar Teva Pharmaceuticals a început distribuţia unor medicamente importate în Israel, în anul 1901. Alte nume de rezonanţă şi astăzi provin de la producători de chimicale precum Agfa şi Bayer în Germania, Solvay în Belgia, Geigy, Ciba şi Sandoz în Elveţia, Imperial Chemical Industries în Anglia sau Pfizer în SUA. Infuzia de capital provenit prin cooptarea magnaţilor financiari ai timpurilor respective, precum şi implicarea factorului politic au contribuit la crearea infrasatructurii de cercetare şi producţie, conducând la apariţia unei game variate de produse farmaceutice. Expediţiile în căutarea plantelor medicinale, derulate intensiv la sfârşitul secolului XIX, au deschis vaste orizonturi, contribuind la diversificarea materiilor prime de origine naturală şi la progresul industriei farmaceutice. Primele corporaţii multinaţionale au apărut prin extinderea unor departamente de producţie şi desfacere în alte ţări, dar mai ales prin fuzionarea firmelor din această industrie.

1.2. Industria farmaceutică din România

Industria farmaceutică românească s-a conturat în marile centre universitare. Învăţământul superior din Cluj datează din anul 1581, când a luat fiinţă Colegiul Iezuit. Cele două mari universităţi clujene, Universitatea de Medicină şi Farmacie şi Universitatea Babeş-Bolyai provin din Universitatea Regală Maghiară Ferencz Josef Cluj, care a fost înfiinţată în anul 1872. Din anul 1992, Universitatea de Medicină şi Farmacie Cluj poartă numele primului său decan, Iuliu Haţieganu. Atestată în anul 1924 ca Universitatea din Cluj, în anul 1959 Universitatea Babeş-Bolyai a primit numele bacteriologului român Victor Babeş şi matematicianului maghiar Janos Bolyai. O altă mare instituţie de învăţământ superior, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară din Cluj, a fost înfiinţată în anul 1869 ca Institutul de Învăţământ Agronomic Cluj-Mănăştur.

În Iaşi, Universitatea Alexandru Ioan Cuza (1860) îşi are originile în vechile instituţii de învăţământ Academia Vasiliană (1640), Academia Domnească (1707) şi Academia Mihăileană (1834). Universitatea de Medicină şi Farmacie Grigore T. Popa din Iaşi a fost înfiinţată în anul 1879. Universitatea de Medicină şi Farmacie Carol Davila din Bucureşti a fost fondată în anul 1857 iar Universitatea din Bucureşti în anul 1864. Mai târziu au apărut Universitatea de Medicină şi Farmacie Târgu Mureş (1945), Universitatea de Vest din Timişoara (1962) şi lista poate continua.

Înainte de 1989, piaţa farmaceutică românească era dominată de producţia internă, fiind subordonată Ministerului Chimiei: Terapia Cluj (1920) în prezent Terapia-Ranbaxy, Biofarm Bucureşti (1921), Antibiotice Iaşi (1955), Uzina de Medicamente Bucureşti (1962) în prezent Zentiva, Sintofarm Bucureşti (1973), Armedica Târgu Mureş (1985) în prezent Gedeon Richter. Institutul de Seruri şi Vaccinuri Dr. Ion Cantacuzino funcţiona încă din anul 1904 ca laborator experimental, însă a primit statut legal în 1921. După 1990 au apărut producătorii privaţi: AC Helcor Baia Mare, Alsifcom (Ferrosan Pfizer) Cluj, Europharm Braşov (GSK), Meduman Vişeu, Labormed Bucureşti, Bio Eel, Lek Pharmatech (Sandoz) şi Vim Spectrum Târgu Mureş, Polipharma Industries Sibiu, Sindan (Actavis) Bucureşti. În Cluj-Napoca, Facultatea de Medicină şi Farmacie Iuliu Haţieganu deţinea o secţie de preparare a soluţiilor perfuzabile şi de asemenea producea spre comercializare produse homeopate, secţii care au supravieţuit un timp după anii 2000. Un muzeu al farmaciei funcţionează din anul 1954 în casa Hintz, un monument istoric în sine,

fiind prima farmacie de stat a Clujului, deschisă în anul 1573. Producători noi precum Alsifcom sau Plant Extrakt au început activitatea. Mai recent industria farmaceutică este bine reprezentată de marii producători din toată lumea, însă doar prin activităţile de promovare şi distribuţie.

În România, condiţiile producerii şi punerii pe piaţă a produselor medicamentoase, precum şi condiţiile şi măsurile pentru asigurare a calităţii sunt reglementate de Guvern (OUG 152/1999 şi Legea 336/2002). **Agenţia Naţională a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale** (ANMDM) asigură realizarea politicii statului în domeniul controlului complex al calităţii medicamentelor şi altor produse de uz uman. Fabricarea produselor medicamentoase se face numai în unităţi de producţie care au obţinut autorizaţia de funcţionare de la **Ministerul Sănătăţii**, iar fabricarea este condiţionată de obţinerea autorizaţiei de punere pe piaţă a produsului medicamentos. Fabricarea industrială a medicamentelor se realizează pe baza recomandărilor făcute de **Ghidul European de Bune Practici** redactat de Comisia Uniunii Europene şi ghidul american de bună practică în industria farmaceutică redactat de *Food and Drug Administration* (FDA). De la 1 decembrie 1995 a intrat în vigoare o ordonanţă a Ministerului Sănătăţii privind producţia şi circulaţia medicamentelor - **Reguli de Bună Practică de Fabricare** (*Good Manufacturing Practice,* GMP). GMP a fost pentru prima dată redactat în anul 1964 de către **Organizaţia Mondială a Sănătăţii** (*World Health Organization*, WHO).

Globalizarea pieţei medicamentelor şi revoluţia digitală influenţează puternic industria farmaceutică, iar dezvoltarea companiilor producătoare este condiţionată de inovaţia adusă inclusiv de biotehnologii, de gradul de cooperare cu alte companii şi de politica lor în domeniul mediului. S-a ajuns la situaţia în care sumele investite în marketing le depăşesc pe cele investite în cercetare (Lexchin, 2018). Lobby-ul farmaceutic cu referire la activităţile marilor companii farmaceutice de a influenţa autorităţile guvernamentale a avut un rol dovedit în determinarea unor decizii şi reglementări favorabile. Finanţarea unor campanii sociale, organizaţii ale pacienţilor ori asociaţii medicale fac parte din strategiile din industria farmaceutică.

1.3. Drepturi de proprietate intelectuală pentru preparatele utilizate în medicina tradiţională

Brevetarea intensivă a unor compuşi activi de către companii farmaceutice, în detrimentul medicinei tradiţionale, a fost intens controversată. Spre exemplu, proprietăţile terapeutice ale frunzelor de salcie erau cunoscute de egipteni încă din antichitate, iar Hippocrate recomanda extractul din scoarţă de salcie pentru combaterea durerii şi a febrei. În anul 1828 salicina a fost purificată iar în 1859 structura chimică a salicilaţilor descifrată, ceea ce a condus la obţinerea sintetică a acidului acetilsalicilic şi producerea medicamentului înregistrat la data de 1 Februarie 1899 de către compania Bayer sub numele de Aspirină. Ulterior, companii farmaceutice occidentale au brevetat medicamente inspirate de medicina tradiţională, fiind acuzate de biopiraterie. De exemplu, se poate elibera un brevet american care să conțină informații sau chiar resurse genetice din medicina tradiţională a unei alte țări. S-a ridicat astfel problema proprietăţii intelectuale asupra medicinei tradiţionale, aflată la intersecţia dintre medicină şi cultură (Murray, 2007). Unele dintre cele mai mediatizate cazuri sunt cel al brevetării proprietăților turmericului (*Curcuma longa*) de

către doi oameni de știință de origine indiană din SUA, şi respectiv a neemului (*Azadirachta indica*) de către W.R. Grace, ambele în anul 1994 (James, 2016). O centralizare a bazelor de date privind medicina tradiţională sunt reunite de către *United States Patent and Trademark Office* (https://www.uspto.gov/patent/laws-and-regulations/comments-public/traditional-knowledge-and-medicine-dictionariesdatabases).

World Intellectual Property Organization (WIPO) este un forum global înfiinţat în anul 1967, ce reuneşte 193 de state membre, la care România a aderat în anul 1970. În prezent, există o coaliţie internaţională a trei organizaţii, WIPO, WHO și *World Trade Organisation* (WTO) ce cooperează la interfața proprietății intelectuale, a comerțului și a sănătății publice, ca parte a eforturilor pentru a sprijini inovarea în tehnologiile de sănătate și pentru a asigura disponibilitatea de medicamente noi și mai eficiente la prețuri accesibile pentru pacienții din toate țările.

În cazul medicinei tradiţionale, protecţia intelectuală poate avea un rol dublu, de protecție pozitivă și defensivă. Protecția pozitivă acordă drept de proprietate intelectuală asupra obiectului cunoștințelor medicale tradiționale şi poate ajuta comunitățile să împiedice accesul nelegitim la cunoștințele medicale tradiționale sau folosirea acestora pentru câștiguri comerciale fără a împărți în mod echitabil beneficiile. De asemenea, poate permite exploatarea activă de cunoștințe medicale tradiționale de către comunitatea originară însăși, pentru a-și construi propriile facilităţi de producţie. Protecția defensivă nu acordă drepturi de proprietate intelectuală asupra cunoștințelor medicale tradiționale, dar are ca scop împiedicarea dobândirii de către terți a acestor drepturi. Strategiile de apărare includ utilizarea cunoștințe medicale tradiţionale documentate pentru a exclude, a se opune sau a invalida brevetele de invenție revendicate care se bazează direct pe astfel de cunoștințe.

În prezent, drepturile de proprietate intelectuală includ brevetul (*patent*), dreptul de autor (*copyright*), marca înregistrată (*trademark*), indicaţiile geografice şi secretul comercial. În general, brevetul constituie cel mai important tip de protecție intelectuală pentru medicamente. Pentru a obține un brevet, invenția trebuie să fie nouă, inovativă și aplicabilă industrial. Un brevet acordă un set de drepturi exclusive pentru un timp limitat, de obicei de 10-20 de ani, care permite inventatorului să împiedice pe alții să copieze, să producă, să folosească, să vândă, să ofere pentru vânzare sau import invenţia, fără permisiune (https://www.wipo.int).

Nu doar lipsa de resurse economice a comunităţilor indigene din zonele mai puţin dezvoltate, dar şi diferenţele dintre abordarea holistică a medicinei tradiţionale şi respectiv dualismul cartezian al medicinei occidentale au dezvoltat o relaţie complexă a acestora cu sistemul proprietăţii intelectuale. Se remarcă progresul digitalizării cunoştinţelor medicinei tradiţionale indiene şi chineze precum şi eforturile de a consacra divulgarea originii şi indicaţiilor geografice în cererile de brevet de invenție (Oguamanam, 2008). Spre exemplu, *Traditional Knowledge Digital Library* (TKDL) documentează literatura existentă referitoare la patru sisteme tradiționale indiene de cunoștințe medicale - Ayurveda, Unani, Siddha și Yoga. TKDL oferă examinatorilor de brevete informații tehnice anterioare, în format digitalizat, în cinci limbi internaționale (engleză, germană, franceză, japoneză şi spaniolă), pentru a preveni acordarea eronată şi neetică a brevetelor. TKDL nu este deschisă publicului, iar oficiile de brevete nu trebuie să dezvăluie conţinutul TKDL niciunei terțe părți, pentru a proteja interesul Indiei împotriva unei eventuale utilizări abuzive.

1.4. Momente remarcabile

Deşi primele descoperiri în domeniul biologiei au avut loc anterior, apariţia ştiinţelor biologice s-a conturat în secolul XIX. Cele mai importante momente care au revoluţionat biologia au o relevanţă specială în domeniul sănătăţii umane, în ceea ce priveşte descoperirea bolilor, a cauzelor acestora şi dezvoltarea de terapii. Evenimentele marcante şi descoperirile cu impact asupra dezvoltării farmaceutice sunt enumerate în **Tabelul 1**. Aspectele inovative ale biotehnologiilor şi biologiei moleculare cu impact crucial în medicină şi biofarmaceutică vor fi punctate pe parcursul acestui curs.

Tabel 1. Momente marcante în biologie, medicină, farmaceutică şi biofarmaceutică.

Anul	Evenimentul
1665	Robert Hooke descoperă celula
1673	Antonie van Leeuwenhoek descrie organismele unicelulare observate la microscop
1735	Carl Linnaeus publică *Systema Naturae*
1796	Edward Jenner, părintele imunologiei, aplică primul vaccin împotriva variolei prin inoculare cu virusul vaccinei bovide (variolizarea)
1803	Izolarea morfinei, comercializată de Merck din 1827
1828	Izolarea şi denumirea salicinei de către Johann Buchner
1831	Robert Brown descoperă nucleul
1853	Sintetizarea aspirinei, comercializată de Bayer din 1897
1859	Charles Darwin publică *Originea speciilor*
1862-1866	Louis Pasteur descrie fermentaţia şi pasteurizarea, face primele cercetări de imunizare prin vaccinare în cazul holerei aviare şi antraxului, creează primul vaccin antirabic
1865	Joseph Lister introduce utilizarea antisepticelor
1879	Theodor Escherich descoperă *Bacterium coli* (*Escherichia coli*)
1884	Walter Flemming descrie mitoza
1885	După obţinerea preparatului împotriva holerei aviare (*Pasteurella* sp.), Pasteur dezvoltă vaccinul antirabic şi demonstrează eficienţa vaccinării
1887	Chimistul Lazăr Edeleanu sintetizează fenilizopropilamina, prima amfetamină
1888	Victor Babeş descoperă protozoarul parazit *Babesia*
1890	Postulatele lui Robert Koch descriu relaţia dintre microb şi boală
1901	Se acordă pentru întâia oară Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină, laureatului Emil Adolf von Behring, pentru dezvoltarea seroterapiei împotriva difteriei Jokichi Takamine izolează şi sintetizează primul hormon, adrenalina
1908	Paul Josef Jakob Gelmo prepară sulfanilamida şi o brevetează în 1909
1911	Thomas Morgan elaborează teoria cromosomială a eredităţii
1913-1941	Descoperirea vitaminelor
1915	Descoperirea virusurilor bacteriofage
1919	Inginerul agricol Károly Ereky introduce termenul de biotehnologie
1921	Nicolae Paulescu izolează insulina
1926	Hermann Joseph Muller demonstrează mutageneza indusă cu raze X
1927	Aurel Babeş concepe testul pentru cancer cervical
1929	Alexander Fleming descoperă penicilina
1932	Gerhard Domagk realizează sinteza promedicamentului Prontosil, considerat primul agent antibacterian din grupa sulfonamidelor Andre Boivin şi Lydia Mesrobeanu descoperă endotoxinele bacteriene
1937	Hans Adolf Krebs descrie ciclul acizilor tricarboxilici Prima antihistamină descperită de Daniel Bovet
1944	Albert Schatz descoperă streptomicina, iar în grupul condus de Selman Waksman sunt ulterior descoperite alte antibiotice
1946	Max Delbruck şi Alfred Day Hershey descoperă recombinarea genetică la virusuri Edward Tatum şi Joshua Lederberg descriu fenomenul de conjugare la bacterii
1950	Barbara McClintock descoperă elementele genetice mobile (transpozonii)

Anul	Evenimentul
1951	George Hitchings şi Gertrude Elion iniţiază designul raţional al medicamentelor, bazat pe mecanismele biochimice şi fiziologice ale bolii
1952	Rita Levi Montalcini izolează primele neurotrofine, factorii de creştere a nervilor
1953	Frederick Sanger secvenţiază insulina conducând la sintetizarea acesteia James Watson şi Francis Crick descriu structura ADN
1955	Arthur Kornberg descoperă şi izolează ADN polimeraza la *E. coli*
1957	Alick Isaacs şi Jean Lindenmann descoperă interferonul
1958	Elliot Volkin şi Lazarus Astrachan descriu pentru prima oară ARN asemănător ADN, denumit ulterior ARN mesager
1959	Gerald Edelmann şi Rodney Porter descoperă independent structura anticorpilor
1961	Marshall Nirenberg, Heinrich Mathaei şi Severo Ochoa descifrează codul genetic François Jacob şi Jaques Monod explică funcţionarea operonului *lac* la bacterii şi avansează ideea controlului exprimării genice prin reglarea transcrierii
1962	Werner Arber descoperă enzimele de restricţie iar ulterior Daniel Nathans şi Hamilton Smith elaborează aplicaţii în biologia moleculară
1967	Mary Weiss şi Howard Green realizează hibridizarea somatică
1972	Paul Berg realizează prima moleculă de ADN recombinat
1973	După clonarea ADN în plasmide, Stanley Cohen şi Herbert Boyer obţin primul organism modificat genetic, o bacterie rezistentă la kanamicină Peter Doherty şi Rolf Zinkernagel demonstrează imunitatea mediată celular
1974	Rudolf Jaenisch creează primul şoarece transgenic Două grupuri de cercetători, conduse de Allan Maxam şi Walter Gilbert (Harvard) şi Frederick Sanger (UK Medical Research Council) dezvoltă tehnicile de secvenţiere a moleculei de ADN
1975	Georges Kohler şi Cesar Milstein produc primii anticorpi monoclonali Edwin Southern publică detaliile tehnicii Southern Blot pentru identificarea secvenţelor de ADN
1976	Doris Morgan descrie factorul de creştere pentru limfocitele T, ulterior denumit interleukina 2; clonarea acesteia în anul 1982 facilitează reuşita transplantului de organe
1977	Descoperirea proteinelor G de către Alfred Gilman şi Martin Rodbell
1978	Genentech anunţă producerea industrială a insulinei cu ajutorul microorganismelor iar ulterior (1982) insulina recombinată este primul medicament obţinut din exploatarea tehnologiei ADN recombinat University of California patentează gena responsabilă de producerea hormonului somatotrop hipofizar Se naşte primul copil conceput prin tehnica fertilizării *in vitro*
1979	Michael Bishop şi Harold Varmus descoperă oncogenele
1980	Kary Mullis inventează reacţia polimerazică în lanţ (PCR) pentru multiplicarea ADN *in vitro*
1982	Stanley Prusiner descoperă prionii
1983	Boehringer Ingelheim produce interferon alfa Trei echipe de cercetători (Mary-Dell Chilton, Jeff Schell, Bob Horsch) anunţă simultan crearea primei plante transgenice
1984	Alec Jeffreys utilizează secvenţierea ADN pentru o nouă metodă de identificare, amprentarea genetică
1985	George Smith dezvoltă tehnica expunerii proteinelor pe suprafaţa bacteriofagilor
1986	Maurice Hilleman creează primul vaccin recombinat împotriva hepatitei B
1987	Yoshikazu Kuwana, urmat de Zelig Eshhar publică studii de imunoterapie ce marchează începutul terapiilor genice celulare CAR-T
1988	Fondarea *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI)
1990	Primul caz de terapie genică înregistrează o reuşită cu efecte temporare pentru imunodeficienţa severă combinată Este iniţiat *Human Genome Project*, colaborare internaţională condusă de Francis Collins de la *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), cu scopul de a secvenţia genomul uman şi a identifica rolul genelor
1992	Este iniţiată terapia genică a cancerului prin intermediul unui vector care exprimă ARN antisens
1998	Andrew Fire şi Craig Mello descoperă interferenţa virală Este aprobată prima terapie pe bază de oligonucleotide în UE (Vitravene, Isis Pharmaceuticals)
2000	Începe decada dezvoltării terapiei genice prin repararea erorilor în ARNm şi proiectarea vectorilor virali pentru livrarea genelor, cu rezultate pentru diverse defecte genetice (talasemie, anemie falciformă, acromatopsie, coroideremie, boli autoimune), împotriva HIV şi a unor forme multiple de cancer
2002	Francis Collins (NHGRI) şi Craig Venter de la Celera Genomics prezintă schiţa genomului uman
2003	Gendicine (Shenzhen SiBiono GeneTech), primul medicament anticancer bazat pe terapie genică este aprobat în China
2006	Aprobarea somatotropinei biosimilare în UE deschide calea biofarmaceuticelor biosimilare

Anul	Evenimentul
2007	Iniţierea *Human Microbiome Project* de către *National Institute of Heath* (NIH), cu scopul de a secvenţia microbiomul uman pentru descifrarea compoziţiei şi a rolului acestuia în starea de sănătate şi de boală Brian Kobilka şi Robert Lefkowitz descriu mecanismul receptorilor cuplaţi cu proteine G (GPCR), în prezent cele mai studiate ţinte farmaceutice
2008	Holoclar (Chiesi Farmaceutici), primul produs biofarmaceutic pe bază de celule stem este aprobat în Italia
2012	Este aprobat în UE şi SUA primul produs biofarmaceutic pentru terapie genică, Glybera (UniQure)
2014	Jennifer Doudna descoperă secvenţele CRISPR şi propune tehnologia CRISPR-Cas
2016	Sunt aprobate primele biofarmaceutice pe bază de celule proiectate (Zalmoxis, MolMed şi Strimvelis, GSK) FDA aprobă un studiu clinic pentru aplicarea sistemului CRISPR-Cas9 în terapia anticancer
2017	Sunt lansate pentru comercializare primele terapii CAR-T (Yescarta, Kite Pharma şi Kymriah, Novartis) CRISPR-Cas9 este aplicat pentru corecţia unei mutaţii a genei responsabile de cardiomiopatia hipertrofică în embrioni umani
2018	Sunt anunţate cercetări controversate de editare genetică a embrionilor umani – afacerea He Jiankui
2019	Este aprobat primul vaccin cu vector viral, împotriva virusului Ebola
2020	Rezultatele preliminare ale unor studii clinice ce implică editarea genomului uman utilizând CRISPR-Cas9 indică faptul că metoda este sigură pentru pacienţi Sunt elaborate metode de diagnostic molecular pentru detecţia SARS-Cov2 utilizând CRISPR-Cas12 Este aprobat primul vaccin pe bază de ARN mesager, împotriva SARS-CoV-2

1.5. Medicamente şi preparate medicamentoase

Remediul constituie orice mijloc capabil să acţioneze favorabil asupra organismului, producând prevenirea unei boli sau chiar vindecarea. Clasificare: remedii fizice, remedii psihice, remedii energetice, remedii chimice. Remediile chimice sunt asocieri de substanţe bioactive şi nu numai, administrate bolnavului pe diferite căi (generală sau sistemică, locală sau topică). Pot fi medicamente sau forme farmaceutice.

Medicamentul reprezintă orice compus chimic pur sau produs complex obţinut de către om, de origine naturală, sintetică sau proprie organismului uman, care execită efecte biochimice şi/sau fiziologice asupra celulei, ţesutului, organului sau organismului ţintă şi poate fi folosit pentru diagnosticul, prevenirea, tratamentul şi ameliorarea bolilor. Poate fi:

a) orice substanță sau combinație de substanțe prezentată ca având proprietăți pentru tratarea sau prevenirea bolilor la om;

b) orice substanță sau combinație de substanțe care poate fi administrată omului, pentru restabilirea, corectarea sau modificarea funcțiilor fiziologice, prin exercitarea unei acțiuni farmacologice, imunologice sau metabolice, sau pentru stabilirea unui diagnostic medical.

Forma farmaceutică, denumită și formă galenică sau medicamentoasă, face referire la configurația în care a fost preparată o anumită substanță medicamentoasă (principiul activ), alături de adjuvanți și excipienți în cadrul unui medicament, dar și doza acesteia. Depinde de modul de administrare: oral, oftalmic, de inhalat, parenteral, topic, rectal, vaginal etc.

Suplimentul alimentar nu este un medicament, dar nici un aliment, ci reprezintă acel produs alimentar al cărui scop este să completeze dieta, constituind o sursă concentrată de nutrienţi sau alte substanţe cu efect nutriţional ori fiziologic, separat sau în combinaţie. Se comercializează

sub formă de doză, cum ar fi: capsule, pastile, tablete, pilule şi alte forme similare, pachete de pulbere, fiole cu lichid, sticle cu picurător şi alte forme asemănătoare de preparate lichide sau pulberi destinate consumului în cantităţi mici, măsurabile. Dispoziţiile legale spun că etichetarea, prezentarea şi reclama nu trebuie să atribuie suplimentelor alimentare proprietatea de prevenire, tratare sau vindecare a unei boli, sau să facă referire la asemenea proprietăți și, de asemenea, nu trebuie să includă afirmaţii care să inducă ideea că o dietă corespunzatoare şi diversificată nu poate asigura cantităţi adecvate de substanţe nutritive.

Drogul este materia primă brută folosită pentru prepararea medicamentelor. Conţine una sau mai multe substanţe active care se pot extrage, izola sau reproduce şi materii balast.

Clasificarea medicamentelor poate fi realizată după mai multe criterii. Astfel, din punct de vedere al concepţiei terapeutice, acestea pot fi:

- Medicamente alopate (gr. *allos* = altul, *pathos* = boală): tratamentul medical constă în administrarea unor medicamente în doze care, la omul sănătos, ar declanșa efecte contrare simptomelor bolii;
- Medicamente homeopate (gr. *homoios* = asemănător, *pathos* = boală): sistem terapeutic individualizat care constă în administrarea în doze foarte mici a substanțelor care, în cantități mari, ar putea provoca unui om sănătos o afecțiune analoagă cu aceea care este combătută;
- Produse placebo (lat. *placere* = a plăcea): produse lipsite de efecte farmacodinamice obiective, care pot avea uneori eficacitate terapeutică datorită sugestiei. Se utilizează fie pentru a-i face plăcere pacientului, fie în scopuri experimentale, pentru a studia efectele farmaceutice ale medicamentului și reacțiile psihice ale pacientului.

După origine:

- Vegetală: morfina, atropina, digoxinul obţinute din diferite părţi ale plantelor (*folium, flores, radix, semen, cortex*);
- Animală: hormoni (insulina porcină, bovină); enzime (tripsina, amilaza);
- Microbiană: antibiotice (penicilina G);
- Minerală: caolinul, bentonita;
- Semisintetică: unele antibiotice (ampicilina);
- Sintetică: chimioterapicele citotoxice, sulfonamidele antibacteriene.

Preparatele medicamentoase sunt constituite din una sau mai multe substanţe medicamentoase (substanţe chimic pure, produse de extracţie, droguri), asociate cu substanţe auxiliare. În compoziţia lor pot intra următoarele tipuri de substanţe:

1. Substanţa sau substanţele medicamentoase: constituie substanţele active principale, responsabile de efectul terapeutic;
2. Substanţele adjuvante: au rolul de a intensifica efectul substanţei active principale sau de a contracara/atenua unele efecte nedorite ale acesteia;
3. Substanţele cu rol corectiv: folosite pentru ameliorarea proprietăţilor organoleptice necorespunzătoare ale substanţelor active principale şi adjuvante (ex. edulcoranţi pentru corectarea gustului, aromatizanţi pentru corectarea mirosului, coloranţi);
4. Excipienţii: substanţe inerte, cu rol de completare a cantităţilor şi de înglobare a tuturor celorlalte ingrediente. În cazul preparatelor lichide excipientul este denumit vehicul;
5. Substanţele ajutătoare tehnic sau aditivi: conservanţi, emulgatori, antiagreganţi, stabilizanţi.

Clasificarea preparatelor medicamentoase de asemenea poate lua în considerare diverse criterii. După starea de agregare:
- Solide;
- Semisolide şi moi;
- Lichide;
- Gazoase.

După calea de administrare:
- Pentru uz extern: se aplică pe tegumentele şi mucoasele accesibile;
- Pentru uz intern: se administrează prin înghiţire sau *per os*;
- Pentru administrare parenterală sau injectabile.

Pentru a preveni unele erori, medicamentele preparate în farmacii se etichetează diferit, în funcţie de calea de administrare. Etichetele preparatelor pentru uz extern au chenar roşu şi menţiunea „extern". Medicamentele administrate *per os* au etichetă cu chenar albastru şi poartă menţiunea „intern". Pe soluţiile injectabile se aplică etichete cu chenar galben, cu inscripţia „injectabil".

După modul de prescriere şi preparare:
- Tipizate (specialităţile farmaceutice): se prepară în formă finită pe scară industrială în fabricile de medicamente, fiind eliberate bolnavilor în farmacii. Au compoziţie fixă, iar aspectul exterior, ca formă, culoare şi ambalaj este constant;
- Magistrale: se prepară în farmacie după prescripţia medicului, având o compoziţie individualizată, indicată de reţetă;
- Oficinale – se prepară în farmacie după modul de preparare prevăzut de farmacopee. Pot fi folosite ca atare sau intră în compoziţia preparatelor magistrale.

După intensitatea acţiunii:
- Toxice şi stupefiante: medicamente care pot determina dependenţă de tipul toxicomaniilor. În farmacopee se găsesc în tabelul cu denumirea generică *Venena*. Se păstrează în farmacii în dulapuri speciale, cu uşi duble, sub cheie. Recipientele care le conţin au etichete cu inscripţie albă pe fond negru, cu pictograma de pericol toxic şi menţiunea „otravă";
- Puternic active: în doze mici au efecte terapeutice bine definite, dar în doze mari determină intoxicaţii primejdioase. Sunt enumerate în farmacopee în tabelul *Separanda*. În farmacii se păstrează în dulapuri separate, recipientele având eticheta cu inscripţia roşie pe fond alb;
- Anodine (obişnuite): au efecte de intensitate mică, se păstrează în farmacii în recipiente etichetate cu inscripţie neagră pe fond alb.

După modul de calculare a dozelor prescrise:
- Forme divizate: se eliberează în doze parţiale (comprimate, fiole, supozitoare);
- Forme care se eliberează nedivizat, dar se împart în doze parţiale la administrare (picături pentru uz intern, poţiuni);
- Forme care nu necesită divizare (unguente, pudre, soluţii pentru uz extern).

Conform **sistemului ATC** (clasificarea anatomo-terapeutică şi chimică), medicamentele se cidifică în următoarele categorii, în funcţie de aparatul sau sistemul asupra căruia acționează:

A - Tract digestiv și metabolism

B - Sânge și organe hematopoetice
C - Sistem cardiovascular
D - Preparate dermatologice
G - Aparat genito-urinar și hormoni sexuali
H - Preparate hormonale sistemice (exclusiv hormonii sexuali)
J - Antiinfecțioase de uz sistemic
L - Antineoplazice și imunomodulatoare
M - Sistem musculo-scheletic
N - Sistem nervos central
P - Produse antiparazitare
R - Aparat respirator
S - Organe senzitive
V - Varia (diverse)
X - Produse fitoterapice, apiterapice, homeopate

Denumirea medicamentelor se ghidează după reguli stricte, reglementate şi aplicate la nivel internaţional. Denumirea chimică a medicamentului indică structura chimică a substanţei active. De multe ori este complicată, fiind folosită numai pentru compuşii cu structură simplă, de obicei anorganici (ex. sulfatul de magneziu).

Denumirea generică a medicamentului poate fi reprezentată de:

- Denumirea comună internaţională (DCI), cea recomandată de WHO, derivă uneori din denumirea chimică, este scurtă şi se foloseşte ca denumire ştiinţifică a substanţelor medicamentoase (ex. ampicilina, denumire chimică conform nomenclatorului *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): (2S,5R,6R)-6-[[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid);
- Denumirea oficinală, cea prevăzută de farmacopee în limba latină. Se foloseşte pentru prescrierea reţetelor magistrale. Uneori coincide cu DCI (ex. *ampicillinum*).

Denumirea comercială este înregistrată şi patentată, stabilită de compania farmaceutică producătoare. Denumirile comerciale reprezintă brevete referitoare la medicamentele în formă finită, pentru substanţa activă şi forma farmaceutică (ex. Aspirin®, Aspenter® etc).

Farmacopeea reprezintă manualul oficial, cu caracter normativ, folosit în practica farmaceutică, conținând descrierea și indicațiile pentru controlul celor mai importante substanțe și formule farmaceutice, cu scopul de a îndruma prepararea, conservarea și întrebuințarea medicamentelor. În România, în prezent este utilizată ediţia a X-a (1993) împreună cu suplimentele în vigoare (2000, 2004, 2006). Se utilizează limba latină, iar denumirile sunt alcătuite după următoarele principii:

- Oxizi, hidroxizi şi săruri: se indică întâi cationul în cazul genitiv, apoi anionul în cazul nominativ (ex. *Magnesii oxydum, Calcii carbonas*);
- Acizi anorganici: denumirea are o structură adjectivală (ex. *Acidum salycilicum*);
- Derivaţii acizilor organici: au denumire cu structură adjectivală (ex. *Phenobarbitalum natricum*);
- Drogurile vegetale: numele plantei (cazul genitiv) precede partea din plantă folosită (cazul nominativ) (ex. *Frangulae cortex, Chamomillae flos*);

- Preparatele oficinale: denumirea formei farmaceutice (cazul nominativ) precede pe aceea a drogului vegetal (cazul genitiv) (ex. *Extractum Belladonnae siccum*).

Majoritatea produselor farmaceutice clasice sunt substanţe organice cu greutate moleculară mică. Deşi unele au fost iniţial izolate din surse biologice, foarte multe sunt produse prin sinteză chimică. Astfel, companiile din industria farmaceutică convenţională fie realizează sinteza chimică a unor compuşi, fie doar formulează produşi farmaceutici din ingrediente achiziţionate ca materie primă.

1.6. Produse biofarmaceutice

Cu toate că doar aproximativ 1% dintre moleculele cunoscute sunt produse naturale, o mare parte din totalul medicamentelor utilizate în prezent sunt cel puțin parțial derivate dintr-o sursă naturală (von Nussbaum şi colab. 2006). Dintre cele 1946 de noi medicamente aprobate de FDA din anul 1981 până în 2019, doar 3,8% conţin molecule naturale nealterate, 0,8% sunt medicamente de origine botanică şi 18,9% conţin derivaţi din produşi naturali (Newman şi Cragg, 2020). Descoperirile ştiinţifice şi inovaţia din industria farmaceutică au condus spre dezvoltarea unei game largi de substanţe medicamentoase obţinute atât prin sinteză chimică sau chimie combinatorială, cât mai ales prin biotehnologii. În prezent, avansul tehnicilor moleculare, transformărilor genetice şi ingineriei proteinelor permite descifrarea mecanismelor bolilor şi dezvoltarea explozivă a unor noi biofarmaceutice cu multiple aplicaţii terapeutice.

Produsele biofarmaceutice, denumite şi produse medicale biologice sunt compuşii medicinali extraşi din surse biologice sau produşi cu ajutorul acestora. Unii dintre aceştia pot fi produşi **pe cale biotehnologică**. Exemple: vaccinuri, hormoni, enzime, sânge sau componente sanguine, alergeni, anticorpi, toxine, proteine recombinate, celule somatice, ţesuturi, acizi nucleici. În termeni farmaceutici, produşii biologici sunt cei obţinuţi din sânge, împreună cu vaccinurile, toxinele şi alergenii. Definiţia FDA precizează că un **produs biologic** este orice virus, ser terapeutic, toxină, antitoxină sau produs analog aplicabil în scopul prevenirii, tratării sau ameliorării bolilor sau rănilor omului. Implicarea biotehnologiilor în sens larg include sistemele biologice (celule, ţesuturi), dar şi moleculele biologice (enzime, anticorpi).

Biotehnologiile farmaceutice în sens larg includ toate produsele farmaceutice obţinute pe cale biotehnologică, chiar şi cele vechi de sute de ani. **Noile biotehnologii** se referă la produşii ingineriei genetice: proteine recombinate, anticorpi monoclonali, ADN recombinat. Aceste „noi" tehnologii sunt totuşi vechi, multe datând din anii 1970. În unele cazuri nu se poate realiza o demarcaţie clară între sinteza chimică şi biotehnologie. De exemplu, antibioticele semisintetice sunt produse prin modificarea chimică a unor antibiotice naturale rezultate în urma fermentaţiei. În prezent, aproximativ **unul din patru medicamente noi eliberate pe piaţă este un produs biofarmaceutic**, majoritatea fiind proteine terapeutice (Walsh, 2018). În plus, în ultimul deceniu, dezvoltarea medicamentelor din categoria terapiilor genetice şi celulare a luat amploare. Biofarmaceuticele au aplicaţii şi în medicina veterinară.

2. NOŢIUNI DE TEHNOLOGIE FARMACEUTICĂ. EVALUAREA BIOFARMACEUTICĂ

Tehnologia farmaceutică studiază noţiunile teoretice şi practice privind formularea, prepararea, păstrarea şi evaluarea biofarmaceutică a medicamentelor. Industria farmaceutică are următoarele **obiective generale:**

- Studiul formulării şi al biodisponibilităţii formelor farmaceutice;
- Studiul operaţiilor generale aplicate în domeniul farmaceutic;
- Studiul proceselor tehnologice specifice, legate de forma farmaceutică;
- Studiul problemelor ridicate de stabilitatea şi conservarea medicamentelor;
- Probleme legate de condiţionarea formelor farmaceutice;
- Probleme legate de controlul calităţii formelor farmaceutice.

2.1. Realizarea medicamentelor

Cercetarea şi dezvoltarea unui medicament contribuie la realizarea efectivă a produsului medicamentos, în etapele de preformulare, formulare şi optimizare a formulării.

I. Preformularea are rol în anticiparea problemelor şi asigurarea căilor logice de rezolvare ale formulării diverselor produse medicamentoase lichide, semisolide şi solide cu acţiune sistemică sau locală. Preformularea ia în considerare atât proprietăţile fizico-chimice ale substanţei medicamentoase cât şi transformările pe care aceasta le poate suferi în organism.

1. Proprietăţi fizico-chimice:
- Caracteristici organoleptice;
- Proprietăţi fizice: solubilitatea, dimensiunea particulelor, starea critalină sau amorfă, forme polimorfe;
- Proprietăţi chimice: stabilitate, interacţiuni sub influenţa temperaturii, umidităţii, oxigenului, luminii, microorganismelor şi a altor factori.

2. Transformări în organism:
- Toxicitatea: acută, cronică, teratogeneza, mutageneza, carcinogeneza, biocompatibilitatea, imunocompatibilitatea;
- Farmacocinetica: absorbţie, distribuţie, metabolizare, excreţie;
- Activitatea terapeutică: locul de acţiune, mecanismul de acţiune, efectele secundare;
- Biodisponibilitatea (profilul optimal).

II. Formularea are scopul de a selecta caracteristicile fizico-chimice şi farmacologice optime ale substanţei medicamentoase, substanţelor auxiliare, materialelor de condiţionare primară, precum şi a parametrilor tehnologiei de obţinere a medicamentului (sistem farmaceutic de cedare a substanţei active sau transport la ţintă) pentru asigurarea acţiunii terapeutice. Formularea determină

compoziţia calitativă şi cantitativă, desemnând cantităţile exacte ale fiecărui component inclus în formula farmaceutică.

Factorii care intervin în formulare:

1. Substanţa medicamentoasă
2. Calea de administrare
3. Forma farmaceutică
4. Substanţele auxiliare
5. Procedeul de fabricare şi de control
6. Materialele şi articolele de condiţionare

1. Substanţa medicamentoasă. Factorii care decid tipul de formulare al substanţei medicamentoase sunt proprietăţile fizico-chimice şi acţiunea terapeutică. Noţiunea de substanţă medicamentoasă (substanţă activă) defineşte substanţa care are proprietatea de interacţiona la nivelul organismului, declanşând un lanţ de reacţii succesive, care se manifestă simultan, sub forma efectului farmacologic. Acţiunea biologică a subtanţelor medicamentoase este determinată de structura chimică a acestora şi implicit de proprietăţile lor fizice, fizico-chimice şi chimice. Prin acţiunea lor, substanţele medicamentoase au capacitatea de a modifica funcţiile celulelor, ceea ce se reflectă asupra întregului organism.

Principiile active sunt substanţe medicamentoase chimic pure, cu efect farmacodinamic. Se clasifică în funcţie de structura chimică, proprietăţile fizico-chimice şi efectele biologice:

- **Alcaloizi** – compuşi organici cu azot, baze cuaternare de amoniu, au reacţie alcalină, iar sărurile lor sunt hidrosolubile. Au efect farmacodinamic puternic (ex. cafeina, morfina, atropina etc);
- **Glicozide** – au molecula formată din o parte neglucidică cu structură steroidică (aglicon sau genină), responsabilă de efectul farmacodinamic şi o parte glucidică (ex. salicina, digitalina, hesperidina, quercitina, amigdalina etc.);
- **Saponine** – au structură glicozidică, agliconul are structură steroidică sau triterpenică. Au proprietăţi tensioactive, emulgatoare, spumante (ex. diosgenina, saponinele din rădăcina de primula etc);
- **Materii tanante** – au structură chimică de derivaţi polifenolici condensaţi. Sunt astringente şi au rol hemostatic datorită precipitării proteinelor extracelulare, dar şi efect antimicrobian (ex. în fructele de afin, frunze de stejar, salcie etc);
- **Uleiurile volatile** (eterice) – compuşi liposolubili, volatili, cu miros aromat. Au acţiune antiseptică şi spasmolitică (ex. uleiul de mentă, cimbrişor, eucalipt etc);
- **Substanţele mucilaginoase** – compuşi cu structură polizaharidică, ce formează cu apa soluţii coloidale vâscoase, realizând o peliculă protectoare la suprafaţa mucoaselor (ex. în nalbă etc).

Clasificarea substanţelor medicamentoase se bazează pe diferite criterii:

- Regiunea acţiunii (ex. glicozide cardiotonice, neurotonice etc)
- Mecanismul de acţiune (anticolinesterazice, inhibitori ai monoaminooxidazei etc)
- Originea lor biologică (preparate vitaminice, hormonale, enzimatice etc)
- Conţinutul de elemente chimice (preparate de sodiu, potasiu, calciu, iod etc)
- Structura chimică (derivaţi ai acidului barbituric, ai piridinei etc)
- Mecanismul de acţiune (remedii curarizante cu acţiune depolarizantă sau antidepolarizantă)

- Modul de acţiune (anticoagulante directe sau indirecte)
- Sursa de obţinere (preparate din degeţel, strofant, lăcrămioară etc).

Substanţele medicamentoase cu acţiune antimicrobiană şi antiparazitară se clasifică, de obicei, după spectrul de acţiune (antibiotice, antituberculoase, antifungice, antihelmintice etc) ori după particularităţile de întrebuinţare (antiseptice, dezinfectante, chimioterapice propriu-zise) etc. Pentru prevenirea unor boli se întrebuinţează remediile dezinfectante, vitamine şi chimioterapice propriu-zise. Chimiprofilactice precum atovaquona, clorochina, doxiciclina, meflochinona sunt utilizate în chimioterapia preventivă a bolilor infecţioase precum tuberculoza, malaria, infecţia HIV-SIDA, maladia COVID-19.

În scopuri curative, substanţe medicamentoase pot fi folosite pentru tratamentul medicamentos simptomatic, etiologic şi patogenetic. Spre exemplu, în cazul bolilor infecţioase:

- Tratamentul etiologic include măsurile destinate anihilării agentului patogen sau a toxinelor eliberate de acesta. Se diferenţiază:

- tratamentul etiotrop propriu-zis: antibacterian, antiviral, antimicotic;
- tratamentul adjuvant pentru imunitate: stimularea organismului pentru a produce anticorpi specifici.

- Tratamentul patogenetic presupune toate măsurile necesare combaterii unor efecte induse de agentul patogen şi corectării unor insuficienţe sau dezechilibre majore, cum ar fi: farmacoterapia antiinflamatoare, anticonvulsivă, depletivă, reechilibrarea hidroelectrolitică, acido-bazică, cardiotonică etc.
- Tratamentul simptomatic urmăreşte combaterea sindromului algic (antialgice), a hiperpirexiei (antitermice), atenuarea tusei (inhibitori centrali), sedare (sedative) etc.
- Tratamentul igienico-dietetic cuprinde repaosul la pat, regimul alimentar (hidro-lacto-zaharat, hiposodat, hipoglucidic, hipoproteic), individualizat.

2. Calea de administrare. Se alege în funcţie de biodisponibilitatea substanţei medicamentoase, viteza de acţiune dorită, durata tratamentului, numărul de doze zilnice. În funcţie de tipul de boală, tipul de bolnav, vârsta bolnavului, situarea tratamentului condiţionează activitatea medicamentului, durata de acţiune, stabilitatea, procedeul de fabricare şi control precum şi materialele şi articolele de condiţionat.

3. Forma farmaceutică depinde de calea de administrare. Există mai multe tipuri de formulări pentru fiecare cale de administrare, iar diferite formulări duc la diferite forme farmaceutice. Acestea sunt destinate anumitor afecţiuni, pentru diferiţi pacienţi şi determină alegerea substanţelor auxiliare. Substanţele auxiliare principale determină starea fizică a formulării şi tipul de formă farmaceutică:

- Forme cu eliberarea imediată (forma dispare în câteva minute de la administrare);
- Formele orale cu eliberare controlată (forma se menţine în timpul trecerii prin tractul gastrointestinal sau numai printr-o parte a lui);
- Formele ultradispersate – ultramicroeterogene (forma traversează, chiar în cantităţi mici, mucoasa intestinală).

4. Substanţele auxiliare. Substantele auxiliare sunt materii prime farmaceutice, inerte din punct de vedere famacologic, care intră în compoziţia unui medicament, în proporţie diferită de cea a substanţei active. Pot fi de origine naturală, de semisinteză sau sinteză şi sunt destinate spre a

aduce substanţa medicamentoasă în forma farmaceutică aptă de a fi administrată bolnavului, având rolul de a transporta medicamentul până la locul de acţiune (în caz ideal fără a interveni în procesul de absorbţie). Subtanţele auxiliare înscrise în farmacopee corespund fie unei entităţi chimice definite (apă distilată, alcool, glicerol, amidon, lactoză etc), fie unui amestec mai mult sau mai puţin complex (lanolină, vaselină, ceară etc). Numeroase substanţe auxiliare sunt utilizate la fabricarea medicamentelor. Unele constituie partea esenţială în realizarea unei forme farmaceutice, constituind solventul, vehiculul sau excipientul. Altele asigură unele calităţi ale formei farmaceutice şi intervin în prevenirea degradării acesteia, cum sunt adjuvanţii şi aditivii. În general nu se poate obţine forma farmaceutică fără substanţe auxiliare.

Pentru fiecare substanţă activă este necesară elaborarea unor forme farmaceutice adecvate, cu efect terapeutic optim, în condiţiile în care trebuiesc asigurate:
- Omogenitatea;
- Stabilitatea fizico-chimică şi microbiologică;
- Administrarea uşoară;
- Biodisponibilitatea optimă;
- Efecte secundare minime;
- Preţ de cost scăzut.

Pe fondul unor caracteristici nedorite ale substanţei medicamentoase pot apărea:
- Absorbţie nesigură;
- Răspândire în întreg organismul;
- Acţiune prea rapidă;
- Degradare la nivel local, hepatic etc;
- Intoleranţă gastrică;
- Inactivarea medicamentului prin modificări fizico-chimice la nivelul tractului gastro-intestinal.

Ca şi condiţie, substanţele auxiliare trebuie să fie inerte din punct de vedere farmacologic faţă de substanţele medicamentoase, materialele de condiţionare şi organismul uman. În caz contar, ele pot influenţa forma farmaceutică, stabilitatea, biodisponibilitatea şi toxicitatea. Substanţele auxiliare îndeplinesc multiple funcţii, precum realizarea unei bune toleranţe şi absorbţii, evitarea alterării şi o mai bună complianţă terapeutică. Substanţele auxiliare un rol pasiv chimic şi în sens reglementar, însă intervin activ pe plan cinetic, clinic, tehnologic, comercial, legal:

A. Pe plan cinetic, este cazul promotorilor de absorbţie care măresc biodisponibilitatea substanţelor active prin următoarele procedee:
- Ameliorează eliberarea substanţelor active (agenţi tensioactivi, lactoză, compuşi hidrofili, polividonă, polietilenglicolii);
- Favorizează dizolvarea (ciclodextrinele prin formarea de compuşi de incluziune) şi cresc viteza de dizolvare a substanţelor active;
- Cresc absorbţia substanţelor active;
- Favorizează pasajul transmembranar (agenţi tensioactivi, chelatanţi).

B. Pe plan clinic, substanţele auxiliare sunt active la nivel biologic, farmacologic, imunologic şi psihologic.

C. Pe plan tehnologic, producţia industrială a medicamentelor şi marketingului unei întreprinderi depind de aportul tehnologic al substanţelor auxiliare. Acestea se clasifică în următoarele grupe de substanţe auxiliare:

- Substanţe auxiliare cu acţiune diluantă;
- Substanţe auxiliare care acţionează datorită tensiunii superficiale
- Substanţe auxiliare care acţionează datorită capacităţii lor de gonflare;
- Substanţe auxiliare care acţionează datorită higroscopicităţii;
- Substanţe auxiliare cu solubilitate selectivă în sucurile gastro-intestinale;
- Substanţe auxiliare care acţionează datorită tensiunii de vapori;
- Substanţe auxiliare care acţionează datorită sarcinii electrostatice;
- Substanţe auxiliare care acţionează asupra stabilităţii fizico-chimice, biologice şi microbiologice;
- Substanţe auxiliare cu rol de corector al caracterelor organoleptice.

D. Pe plan comercial, substanţele auxiliare au rol în creşterea productivităţii şi îmbunătăţirea complianţei terapeutice. Spre exemplu, reducerea impactului ecologic prin înlocuirea freonului cu alţi agenţi în sistemele de aerosolizare.

E. Pe plan legal, se impune ca substanţele auxiliare să fie trecută pe etichetă, iar reacţiile adverse, efectul placebo, efectul nocebo şi apariţia prin fenomene psihologice de simptome neplăcute după administrarea unui medicament să fie documentate.

F. Pe plan actual se proiectează noi excipienţi, atât ca variante multiple de excipienţi (amidon modificat), asocieri de excipienţi (formule sau amestecuri precum zahăr/amidon/dextrine), dar şi noi substanţe auxiliare (biopolimeri). Modalităţile de testare au evoluat spre noi explorări toxicologice, de biocompatibilitate, hemocompatibilitate şi imunocompatibilitate. În viitor, acţiunea substanţelor auxiliare va fi dirijată asupra timpului pentru eliberarea dozei terapeutice, a locului de acţiune şi a acţiunii în sine.

5. Procedeul de fabricare şi de control. Procesul tehnologic farmaceutic constituie succesiunea de etape în care substanţele medicamentoase şi substanţele auxiliare adecvate sunt transformate prin operaţii farmaceutice în forma farmaceutică corespunzătoare, introduse într-un recipient de condiţionare şi ambalaj specific. Constă practic în transformările succesive la care sunt supuse materiile prime. Tipul de materii prime, proprietăţile fizico-chimice şi tehnologice ale acestora, modul de formulare prin asocierea mai multor materii prime, proporţiile şi interacţiunile acestora sunt foarte importante pentru dezvoltarea unui medicament adecvat scopului terapeutic urmărit. Pentru evidenţierea unor dificultăţi şi identificarea procedeelor neadaptabile la substanţa farmaceutică luată în lucru, se evaluează diferenţele între caracteristicile teoretice ale formei farmaceutice şi caracteristicile sale reale.

6. Materialele şi articolele de condiţionare realizează condiţionarea primară şi condiţionarea secundară. Recipientul de condiţionare primară trebuie să îndeplinească câteva norme de calitate: să fie rezistent la un domeniu larg de temperatură şi de umiditate, să protejeze de influenţa luminii, să aibă o rezistenţă mecanică adecvată, să împiedice pătrunderea de lichide şi gaze, să nu reacţioneze fizic sau chimic cu medicamentele pentru a nu altera puritatea, calitatea, sterilitatea, conţinutul în substanţă medicamentoasă. Materialul care vine în contact direct cu medicamentul are următoarele roluri: protector (izolează şi păstrează medicamentul în timp), funcţional (facilitează utilizarea), de identificare şi de informare (denumire, indicaţii de utilizare, precauţii etc).

Recipientul de condiţionare secundară (ambalajul) este de cele mai multe ori realizat din carton inscripţionat, nevând influenţă directă asupra stabilităţii şi conservării. Permite manipularea, transportul, identificarea şi informarea bolnavului cu privire la conţinut (Leucuţa 2007; Popovici şi Lupuleasa 2001; 2009).

Planurile experimentale. Toate variabilele de formulare şi preparare conduc la anumite caracteristici ale preparatului medicamentos. Numărul mare de variabile sugerează şi numărul mare de experimentări necesare pentru a identifica varianta optimă, prin urmare utilizarea planurilor experimentale şi optimizarea formulării sunt foarte importante. Diversitatea formelor farmaceutice este mare, proprietăţile acestora, deşi respectă condiţiile generale de calitate, prezintă şi particularităţi cu diferenţe semnificative între două medicamente. Prin urmare şi formularea unor forme farmaceutice diferite este diferită.

Înainte de începerea experimentării este nevoie de o decizie asupra testelor care trebuie efectuate, de o strategie experimentală. Debutul studiului presupune un plan de lucru, prin conceperea designului experimental, a proiectului experimental. Obiectivele unui studiu experimental pot fi de:

- Screening, pentru determinarea factorilor care influenţează fenomenul studiat;
- Comparare, cu scopul de a identifica dacă un factor influenţează semnificativ răspunsul;
- Optimizare, pentru a determina influenţa fiecărui factor, interacţiunile dintre factori, efectele şi forma răspunsului care a fost investigat.

Este necesar să se folosească metode care ţin de planuri experimentale şi metode de optimizare pentru a alege eficient experimentele care trebuie realizate şi pentru a obţine informaţii de încredere şi coerente. Acest mod de abordare este tot mai mult utilizat astăzi în cercetarea şi dezvoltarea formulării farmaceutice în scopul preparării în mod raţional, ştiinţific şi economic a medicamentelor. Esenţa planurilor experimentale constă în planificarea inteligentă a determinărilor experimentale şi analiza statistică a rezultatelor, în vederea obţinerii unui model matematic cu ajutorul căruia se poate prezice evoluţia răspunsurilor în domeniul experimental studiat. Un proces experimental, inclusiv formularea unui medicament, parcurge următoarele etape:

1. Definirea problemei
2. Alegerea factorilor care se cercetează şi a nivelului de variaţie a acestora (variabilele independente)
3. Alegerea răspunsurilor convenabile (variabilele dependente)
4. Selectarea planului experimental, respectiv a modelului
5. Realizarea determinărilor experimentale şi obţinerea datelor
6. Analiza datelor şi interpretarea rezultatelor experimentale
7. Concluzii.

În funcţie de strategia adoptată, studiul unui fenomen se poate realiza în model clasic sau adoptând o strategie nouă, care presupune utilizarea planurilor experimentale. În metoda clasică se fixează nivelul tuturor variabilelor, cu excepţia uneia. Metoda planurilor experimentale presupune modificarea nivelului tuturor factorilor, dar în mod programat şi justificat. Avantajele acestei metode sunt:

- Reducerea numărului de determinări
- Posibilitatea studierii unui mare număr de factori

- Posibilitatea decelării unor eventuale interacţiuni între factori
- Posibilitatea găsirii unor valori optime
- Obţinerea unei precizii mai bune a rezultatelor
- Optimizarea şi modelarea rezultatelor (Leucuţa 2011).

III. Optimizarea formulării face parte din etapa de dezvoltare preclinică. Tehnologia farmaceutică modernă vizează două scopuri: aducerea intactă a substanţei active la locul de acţiune în organism şi realizarea profilului de eliberare optimă a substanţei active pentru a-şi exercita acţiunea. Optimizarea biodisponibilităţii unui medicament se poate realiza în principal pe 3 căi:
A. Modularea proprietăţilor biofarmaceutice ale substanţelor active
B. Adaptarea formulării şi a formei farmaceutice administrate
C. Modificarea mediului din compartimentele organismului

Optimizarea proprietăţilor biofarmaceutice reprezintă o problemă de interes deosebit pentru designul modern al unui medicament. Proprietăţile biofarmaceutice ale substanţelor sunt proprietăţi fizico-chimice şi biologice care determină acceptarea medicamentului de către bolnav, dar au implicaţie şi în farmacocinetică. Modularea proprietăţilor bio-fizico-farmaceutice au impus trei tipuri de substanţe medicamentoase:

1. **Derivaţii bioreversibili analogi** se obţin prin modificări de schelet şi/sau prin introducerea sau eliminarea în/din molecula unei substanţe medicamentoase de substituenţi, fără modificarea efectului biologic în cazul în care relaţia structură-activitate permite acest tip de modulare. Aceasta face ca noile preparate să aibă acelaşi tip specific de acţiune ca şi substanţa de bază, dar să manifeste un comportament farmacocinetic diferit.

2. **Promedicamentele** sunt substanţe biologic active rezultate prin modularea structuri chimice a substanţelor de bază. Au activitate biologică numai *in vivo*, pe cale enzimatică sau neenzimatică. Sunt realizaţi cu scopul de a înlătura unele proprietăţi nedorite ale substanţelor cum ar fi gustul amar, inducerea iritabilităţii, solubilitate redusă, absorbţia şi/sau stabilitatea redusă.

3. **Derivaţii hibrizi** constituie un grup intermediar între cei analogi şi promedicamente, ce cuprinde substanţe medicamentoase mai puţin active a căror activitate este potenţată prin metabolizare *in vivo*. Aparţin categoriei derivaţilor analogi pentru că îşi păstrează acţiunea specifică prin metabolizare şi sunt parţial prodroguri întrucât potenţarea acţiuni lor are loc *in vivo*, enzimatic sau neenzimatic.

Optimizarea nu are un sens absolut, ci are scopul de a realiza cea mai bună formulare în condiţiile existenţei unor restricţii. Un medicament trebuie să aibă o formă farmaceutică care să furnizeze o doză corectă de substanţă medicamentoasă activă terapeutic, biodisponibilă, stabilă şi să dispună de o prezentare agreabilă.

Formularea urmăreşte câteva obiective în ceea ce priveşte medicamentul: să corespundă scopului, să fie lipsit de toxicitate, neiritant, spre a fi acceptat de pacient. Un concept actual în cercetarea şi producţia de medicamente îl reprezintă acela de calitate prin design. Calitatea nu se asigură doar prin determinarea în produsul finit, ci ea trebuie conferită pe parcursul formulării şi preparării acestuia. Producţia industrială a medicamentelor se face aplicând Regulile de bună practică de fabricaţie (GMP) şi impune responsabilităţi farmaceutice prin documente ce dovedesc validarea tuturor proceselor (Leucuţa 2011).

2.2. Obţinerea acţiunii terapeutice

În paralel cu aportul tehnologiei farmaceutice în definirea biofarmaciei, farmacologia, prin farmacocinetică şi farmacodinamie, îşi aduce contribuţia la evaluarea răspunsului terapeutic după administrarea medicamentului în organism. Biofarmacia este ştiinţa care se ocupă cu studiul factorilor ce influenţează biodisponibilitatea medicamentelor. Biodisponibilitatea reprezintă concentraţia de substanţă medicamentoasă nemodificată existentă prin formarea **curbei plasmatice** ca urmare a corelaţiei între nivelul substanţei în sânge şi acţiunea terapeutică. Orice produs medicamentos este susţinut în existenţa lui de două etape:

1. Realizarea medicamentului pornind de la substanţa medicamentoasă caracterizată fizico-chimic şi farmacologic, prin preformulare, formulare şi preparare într-o formă farmaceutică sau sistem terapeutic, utilizând o tehnologie adecvată, ambalare şi păstrare corespunzătoare;

2. Obţinerea acţiunii terapeutice după administrarea medicamentului printr-o absorbţie şi biodisponibilitate conformă cu obiectivele stabilite în faza de formulare şi preparare.

Acţiunea terapeutică a medicamentelor depinde în mare măsură de concentraţia lor în organe şi ţesuturi. Aceasta este determinată atât de doza de substanţe medicamentoase, cât şi de absorbţia şi distribuirea în ţesuturi şi organe, inclusiv depozitarea, transformarea biologică şi eliminarea din organism. În afară de acestea, acţiunea substanţelor medicamentoase este condiţionată de efectele biochimice şi fiziologice care apar în organism sub influenţa medicamentului, datorită localizării acestuia şi mecanismului de acţiune. Acţiunea substanţelor medicamentoase depinde, de asemenea, de sensibilitatea organismului la medicamente, de vârstă, sex şi de mulţi factori genetici, precum şi de ritmul biologic. Efectul substanţelor medicamentoase este determinat şi de starea funcţională (patologică şi fiziologică) a organelor şi sistemelor, calea de administrare a substanţelor medicamentoase, forma medicamentoasă, interacţiunea medicamentelor, interacţiunea substanţelor medicamentoase cu conţinutul tubului digestiv etc (**Figura 1**).

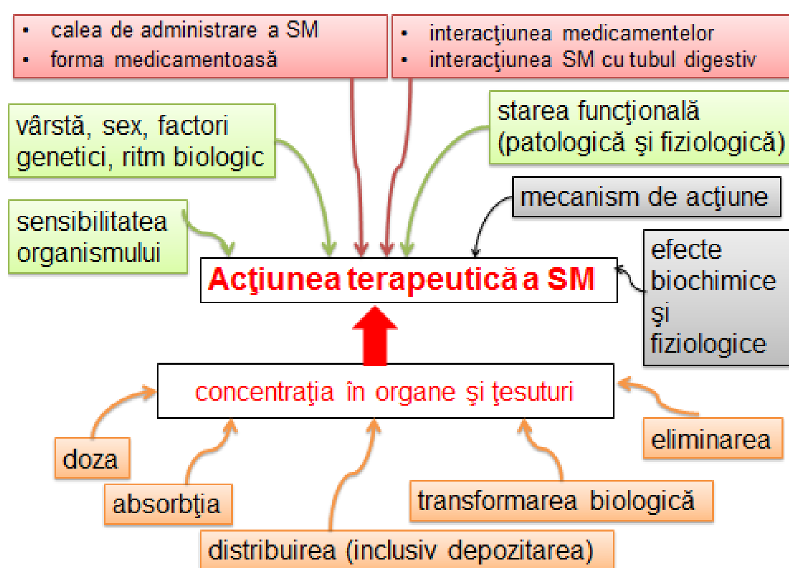


Figura 1. Factorii ce influenţează realizarea acţiunii terapeutice a substanţei medicamentoase (SM).

De la administrarea medicamentului până la apariţia efectului terapeutic au loc în organism o serie de faze succesive: biofarmaceutică, farmacocinetică şi farmacodinamie.

1. Faza biofarmaceutică are ca obiectiv eliberarea substanţei medicamentoase şi dizolvarea acesteia în lichidul biologic. Sistemul de clasificare biofarmaceutică (BCS) se bazează pe determinarea procesului care controlează viteza de absorbţie a substanţei medicamentose şi implicit solubilitatea, viteza de dizolvare şi permeabilitatea prin membrana intestinală. Există patru tipuri de substanţe medicamentoase:

a) Clasa I BCS - solubilitate şi permeabilitate înalte, foarte bine absorbite în organism;
b) Clasa II BCS - solubilitate redusă şi permeabilitate înaltă;
c) Clasa III BCS - solubilitate înaltă şi permeabilitate redusă;
d) Clasa IV BCS - solubilitate şi permeabilitate scăzute.

2. Faza farmacocinetică cuprinde evoluţia substanţei medicamentoase în organism, reprezentând modificările cantitative şi calitative în timp, în procesele de absorbţie, distribuţie, metabolizare şi eliminare (ADME):

- Absorbţia reprezintă trecerea substanţei medicamentoase în circulaţia sanguină;
- Distribuţia în circuitul sanguin poate favoriza legarea de proteinele plasmatice, cu consecinţe în exprimarea corectă a biodisponibilităţii;
- Metabolizarea în organism în cadrul unor procese biochimice determină modificarea proprietăţilor fizico-chimice şi farmacodinamice;
- Eliminarea substanţei medicamentoase din organism se face sub formă de metaboliţi activi sau inactivi, prin rinichi sau alte căi de eliminare (pulmonar, piele, salivă, glanda mamară).

Procesele ADME prin care trece o substanţă medicamentoasă după administrarea medicamentului sunt caracterizate printr-o serie de parametri specifici care asigură stabilirea dozelor în farmacoterapie, biodisponibilitatea substanţei medicamentoase dintr-o formă farmaceutică şi reducerea efectelor toxice. Parametrii farmacocinetici sunt reprezentaţi de: concentraţia plasmatică, viteza de absorbţie, volumul aparent de distribuţie, eliminarea din sânge, excreţia, timpul de înjumătăţire al substanţei medicamentose.

3. Faza farmacodinamică este reprezentată de interacţiunea moleculelor substanţei medicamentoase cu receptorii şi declanşarea unor modificări fiziologice cu apariţia efectului farmacodinamic. Factorii farmacodinamici se referă la locul acţiunii, mecanismul de acţiune care determină tipul farmacodinamic, efectul maxim, latenţa, durata. Reactivitatea individuală include organismul în contextul factorilor fiziopatologici şi a celor dependenţi de tipul de administrare, alimentaţie, eventuale interacţiuni medicamentoase etc.

2.3. Biodisponibilitate, bioechivalenţă şi biosuperioritate

Varietatea formelor farmaceutice este determinată de evoluţia condiţiilor ştiinţifice şi tehnice care s-au conformat unor exigenţe ale terapiei medicamentoase. Postulatul echivalenţei, care prevedea faptul că doza indicată pe eticheta medicamentului este şi doza absorbită de organism a fost infirmat de insuccese terapeutice datorate subdozărilor şi de accidente datorate supradozărilor.

Postulatul bioechivalenţei stabileşte că doza indicată pe etichetă nu este egală cu doza absorbită şi este fondat pe un nou parametru farmaceutic, biodisponibilitatea. Conform acestui postulat pot fi considerate bioechivalente numai preparatele cu aceeaşi biodisponibilitate.

Biodisponibilitatea reprezintă concentraţia de substanţă medicamentoasă nemodificată existentă prin formarea curbei plasmatice ca urmare a corelaţiei între nivelul substanţei în sânge şi acţiunea terapeutică. Prin urmare, biodisponibilitatea este caracterizată prin două variabile: cantitatea relativă de substanţă medicamentoasă absorbită şi viteza cu care se produce absorbţia. Biodisponibilitatea substanţelor medicamentoase este în concordanţă cu tipul de cedare, dizolvare şi absorbţie, precum şi cu forma medicamentului (tipul de administrare). Spre exemplu, în cazul moleculelor mici cu administrare orală:

a) Biodisponibilitatea soluţiilor medicamentoase este mai mare comparativ cu a altor forme farmaceutice, substanţa activă fiind dizolvată la nivel de molecule şi ioni disponibili pentru absorbţie.

b) Pulberile medicamentoase asigură o viteză de dizolvare mare a substanţei active, o absorbţie şi o biodisponibilitate superioară altor forme farmaceutice solide orale.

c) Formele solide administrate pacienţilor ca soluţie (granulele efervescente) sau suspensie fluidă (granulele pentru suspensii reconstituibile) oferă avantajele unei absorbţii rapide cu biodisponibilitatea substanţei active la nivelul preparatelor lichide.

d) Comprimatele sunt utilizate cu cea mai mare frecvenţă pentru acţiuni terapeutice diferite: imediată, eliberare şi absorbţie accelerată, acţiune prelungită sau o cedare cu viteză controlată în vederea realizării unei concentraţii constante de substanţă activă în sânge timp de 24 ore, zile, săptămâni. Gradul de dizolvare şi biodisponibilitatea substanţei medicamentoase din comprimate sunt influenţate de adjuvanţi şi aditivi cu rol diluant, liant, dezagregant, lubrifiant, colorant, de învelişul de acoperire necesar în scopul conservării, dirijarea substanţei active la nivelul intestinului, prelungirii acţiunii etc.

Pentru toate medicamentele, scopul cedării este de a maximiza eficacitatea terapeutică prin transportul și eliberarea substanţei medicamentoase (pasiv sau activ) la locul țintă din corp și prin minimizarea acumulării în afara țintei a medicamentului. Acest lucru poate fi realizat prin controlul farmacocineticii, îmbunătăţirea stabilității, reducerea toxicității, acumularea medicamentului la locul țintă și îmbunătățirea compleanţei. Inovația în tehnologiile și strategiile de livrare a fost catalizată de identificarea provocărilor asociate fiecărei clase de molecule bioterapeutice: molecule mici (proprietăţi fizico-chimice, solubilitate), proteine şi peptide (stabilitate, imunogenitate, selectivitate pentru ţintită), anticorpi (bariere biologice), acizi nucleici (acces în citosol sau nucleu, prevenirea inserţiei în afara ţintei), celule vii (persistenţă, viabilitate, fenotip terapeutic, tehnici de fabricaţie). Astfel, **strategiile ce conduc la îmbunătățirea biodisponibilităţii** vizează:

a) Modificarea substanţei medicamentoase / produsului biofarmaceutic: modificarea grupărilor funcţionale, substituţia unor aminoacizi, conjugarea cu diverşi liganzi, inclusiv polietilenglicol (PEG), ingineria genetică, stimularea şi diferenţierea celulară;

b) Modificarea compartimentului receptor: schimbarea pH-ului, îmbunătăţirea permeabilităţii, eludarea sistemului endosomal, îmbunătăţirea dispersiei, inhibiţia clearance-ului moleculei, normalizarea condiţiilor (ex. vascularizaţia tumorilor), modelarea microbiomului gazdei;

Au fost concepute şi optimizate diverse sisteme de livrare pentru o cedare ţintită, controlată, cât mai adecvată compusului terapeutic: dispozitive de microinjectare, plasturi transdermici, sisteme cu microparticule cationice, multiparticule, microparticule învelite, nanoparticule, nanoparticule lipidice, tehnici de microîncapsulare, sisteme conjugate anticorp-medicament, dispozitive intrauterine, implanturi ce oferă eliberare controlată, inhalatoare, filme polimerice, dispozitive injectabile, capsule pH-dependente, pansamente impregnate, lentile de contact încărcate cu substanţe terapeutice, hidrogel bioactiv. Totuşi, bunele practici de fabricaţie şi principiile conceptului de calitate prin design sunt dificil de aplicat noilor terapii celulare. Provocările sunt date de identificarea atributelor critice care pot fi utilizate pentru a asigura calitatea terapeutică și funcționarea după producție. Eforturile de îmbunătățire a eficacităţii şi siguranţei acestor terapii a condus la noi abordări, precum platformele microfluidice (Vargason şi colab. 2021).

Pentru a substitui un medicament cu altul, trebuie ca cele două **să conţină aceeaşi substanţă medicamentoasă şi să fie bioechivalente.** Echivalenţa medicamentelor reprezintă un termen relativ, care compară efectul terapeutic sau un ansamblu de condiţii de calitate ale unui produs cu aceiaşi parametri ai altui medicament. Sunt considerate bioechivalente două preparate farmaceutice cu substanţe active echivalente chimic, care administrate la acelasi individ, în aceeaşi posologie, realizează concentraţii plasmatice şi tisulare echivalente în timp (biodisponibilitatea lor este diferită nesemnificativ, <5%). Cele mai importante tipuri de echivalenţă sunt:

- Echivalenţa chimică se referă la echivalenţa între medicamentele care conţin aceeaşi substanţă activă şi aceeaşi doză, dar forme farmaceutice diferite (ex. pulbere injectabilă sau comprimate filmate);
- Echivalenţa farmaceutică reprezintă echivalenţa între medicamentele care conţin aceeaşi substanţă activă, aceeaşi doză şi acelaşi tip de formă farmaceutică dar substanţe auxiliare diferite şi/sau tehnologie diferită de preparare (ex. comprimate filmate, capsule moi, pulbere orală);
- Echivalenţa farmacologică se referă la echivalenţa între medicamentele cu acelaşi efect farmacologic, la care substanţa activă poate să fie diferită. Condiţia este ca ambele structuri să se metabolizeze în organism la aceeaşi structură chimică activă (ex. promedicamentele precum procain penicilina, cloramfenicol palmitat);
- Echivalenţă terapeutică se referă la echivalenţa între medicamentele cu aceeaşi eficacitate terapeutică la acelaşi individ, aceeaşi doză, indiferent dacă medicamentul prezintă numai echivalenţă chimică, farmaceutică sau farmacologică;
- **Echivalenţa biologică (bioechivalenţa)** se referă la echivalenţa între medicamentele care au: echivalenţă chimică, echivalenţă farmaceutică şi biodisponibilitate identică.

Biofarmaceuticele biosimilare bazate pe proteine recombinate pot prezenta diferențe datorate modificărilor post-translaționale (fosforilare, glicozilare) și proceselor de fabricație diferite. Termenul de **biosuperioritate** (*biobetter*) este folosit pentru desemna macromoleculele terapeutice de nouă generație, care prezintă un sistem de administrare mai eficient al medicamentului, sunt modificate prin metode chimice (de ex. conjugate cu polietilenglicoli) și / sau proiectate prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară pentru proprietăți farmacologice mai bune (activitate îmbunătățită, stabilitate sporită, efecte secundare reduse, imunogenitate scăzută). Prin urmare, în timp ce un biosimilar reprezintă o versiune generică a biofarmaceuticului original, un produs biosuperior necesită cercetare și dezvoltare originală, iar costurile sunt semnificativ mai mari.

3. CONCEPŢIA ŞI DEZVOLTAREA NOILOR MEDICAMENTE

Principalele etape ale concepţiei şi dezvoltării medicamentelor (*drug discovery and development*) constau în identificarea şi validarea ţintei terapeutice, selecţia moleculei candidat, crearea şi formularea noului medicament, optimizarea produsului, dezvoltarea acestuia şi lansarea pe piaţă, iar ulterior urmărirea post-marketing a medicamentului. În cazul descoperirii *de novo,* intervalul cuprins între debutul cercetărilor şi finalizarea produsului medicamentos păstrează o durată medie de 13-17 ani. Costurile dezvoltării unui nou medicament sunt în continuă creştere, în prezent fiind estimate la circa 2,6 miliarde de dolari (DiMasi şi colab. 2016).

Odată ce un compus a fost identificat ca fiind un **potenţial candidat**, se parcurg o succesiune de etape pentru a dovedi că **noul medicament este sigur şi eficient**. Toate procesele se desfăşoară conform unor proceduri atent întocmite de către producător, conform reglementărilor în vigoare, şi sunt atent monitorizate de autorităţile abilitate. În general, se estimează că din circa 10.000 de molecule testate, doar 3-5 ating faza de cercetare clinică şi una singură ajunge pe piaţă sub forma unui nou medicament.

Descoperirea de noi medicamente este motivată de o nevoie clinică nesatisfăcută generată de o boală sau o stare clinică ce nu dispune de produse medicale adecvate. Cercetarea inițială generează date pentru a dezvolta o ipoteză conform căreia inhibarea sau activarea unei proteine sau a unei căi va duce la un efect terapeutic. Rezultatul acestei activități este selectarea unei ținte biologice a medicamentului (*drug target*). Genomica și proteomica au realizat progrese considerabile în ultimii ani, numărul total de posibile ținte terapeutice fiind estimat la peste 3.000 (Oprea şi colab. 2018). După realizarea metodologiilor necesare de testare şi validarea suplimentară a ţintei biologice se obțin biblioteci de **compuși candidați la dezvoltare**, pentru a identifica compuși *hit* și apoi *lead*. Compusul candidat va progresa în cercetarea preclinică și, dacă va avea succes, în dezvoltarea clinică, iar în cele din urmă va primi aprobare şi va fi un medicament comercializat. Entităţile implicate în descoperirea şi dezvoltarea unui medicament sunt reprezentate de componenta academică, cea industrială şi de organizaţiile comerciale de cercetare (*Contract Research Organizations*).

3.1. Etapele cercetării şi devoltării medicamentelor

Succesiunea etapelor implicate în concepţia şi dezvoltarea unui nou medicament este următoarea:

1. Identificarea şi validarea ţintei terapeutice (*drug target*). Ţinta medicamentului reprezintă locul de legare a compusului terapeutic, pe baza recunoaşterii moleculare. Este o moleculă din corp (de obicei o genă, un transcript ARN sau o proteină) intrinsec asociată unei boli și care ar putea fi abordată de un medicament pentru a produce un efect terapeutic dorit. În cazul bolilor infecţioase, ţinta este localizată fie în agentul infecţios, fie în corpul gazdei. Cele mai

comune exemple de ţinte terapeutice proteice sunt receptorii (de ex. receptorii cuplaţi cu proteine G - *G protein-coupled receptors*, GPCRs, ce constituie circa 50% din ţintele biologice), enzime, molecule de transport, canale ionice, tubuline, imunofiline. Ideea pentru o țintă poate proveni dintr-o varietate de surse, fiind de regulă generată de cercetări academice, dar și clinice sau din sectorul comercial. Cercetările recente în domeniul patologiei permit descifrarea mecanismelor biologice şi biochimice ale bolii, îngustând astfel direcţiile de sondare în scopul identificării principiilor active. Validarea moleculei ţintă este facilitată de secvenţierea şi descifrarea mecanismelor genelor implicate în starea patologică. Se investighează eventualele asociaţii între secvenţele genelor şi exprimarea acestora, respectiv apariţia unor proteine modificate.

2. Selecţia compuşilor candidat (*candidate selection*). Metodele tradiţionale de identificare de noi principii active se bazează pe screeningul cu randament sporit (*high throughput screening, HTS*) al unui mare număr de surse naturale de compuşi bioactivi, prin testarea unor compuşi utili cu proprietăţi mai mult sau mai puţin cunoscute şi pe investigarea unor molecule chimic similare unora cu efect terapeutic cunoscut, intervenindu-se cu modificarea configuraţiei moleculare. Prelucrarea bioinformatică şi extragerea informaţiilor din bazele de date biomedicale au condus la creşterea randamentului în identificarea moleculelor candidat.

3. Identificarea şi testarea compuşilor promiţători (*hit-to-lead*). Un compus *hit* este cel care manifestă activitatea dorită, iar aceasta se confirmă la retestare. Un compus *lead* este definit ca un *hit* confirmat de mai multe teste *in vitro* și, dacă este posibil, *in vivo*, într-un mod care arată o activitate relevantă din punct de vedere biologic, care se corelează cu ținta (Hughes şi colab. 2011). Compusul *lead* trebuie să dovedească o relație structură-activitate, prin urmare demonstrează asocierea ţintei biologice cu un potenţial nou medicament. Se verifică multiple opţiuni de compuşi asemănători, cu structura chimică uşor modificată, pentru a obţine o interacţiune optimă receptor-ligand, deci o afinitate biologică în sensul maximizării efectului terapeutic.

4. Optimizarea candidatului principal (*lead optimization*) este etapa în care fiecare dintre moleculele promiţătoare este tesatată *in vitro* şi *in vivo* (pe rozătoare), analizându-se proprietăţile fizice, chimice şi biologice: relaţia structură-funcţie, potenţa, farmacocinetica exploratorie, metabolizarea, toxicologia exploratorie. În urma acestor etape se va selecta varianta celui mai bun **medicament potenţial sau medicament candidat (*candidate drug*).** Fabricarea loturilor în vederea dezvoltării preclinice se realizează în staţii pilot.

5. Dezvoltarea şi testarea preclinică (*preclinical research*). Odată identificat un candidat *lead*, debutează un program tipic de dezvoltare preclinică ce constă în șase direcţii majore:

a) Fabricarea substanței medicamentoase;
b) Preformulare și formulare (designul dozelor);
c) Dezvoltarea și validarea metodelor analitice și bioanalitice;
d) Studierea metabolismului și farmacocinetica;
e) Analiza toxicologică (siguranță, toxicologie genetică și farmacologie de siguranță);
f) Fabricarea și documentarea bunelor practici de fabricație (GMP) a produselor medicamentoase pentru utilizare în studiile clinice.

Aceste activități sunt rareori distincte și secvențiale, mai degrabă sunt interconectate și deseori simultane, rezultatele fiecărei activități informând celelalte etape pe măsură ce medicamentul candidat progresează prin caracterizare și optimizare (Steinmetz şi Spack 2009).

Datele esenţiale ale cercetării şi dezvoltării preclinice efectuate asupra noului medicament, în timpul perioadei de concepere şi formulare se centralizează în trei dosare: farmaceutic, farmacologic şi toxicologic. Acestea conţin următoarele informaţii:

I. Dosarul farmaceutic:

- Date chimice, analitice şi farmaceutice
- Specificaţii relative la fiecare substanţă medicamentoasă şi auxiliară
- Specificaţii relative la fiecare formă farmaceutică
- Descrierea procedeului de fabricare: controlul materiilor prime (substanţe medicamentoase, substanţe auxiliare, materiale de condiţionare), controlul produsului finit (norma de calitate), descrierea condiţiilor de depozitare
- Recipiente
- Stabilitate
- Cercetări de biodisponibilitate pentru substanţa activă şi forma farmaceutică
- Interacţiuni medicamentoase

II. Dosarul farmacologic preclinic:

- Farmacocinetică (profil ADME)
    - eliberare
    - absorbţie
    - concentraţie sanguină
    - concentraţie plasmatică
    - legare de proteine
    - distribuţie
    - biotransformare
    - eliminare
    - cinetică la doze repetate
    - mod de administrare la om
    - timp de înjumătăţire
- Farmacodinamie
    - efecte pe animale sănătoase, pe organismul întreg şi pe organe
    - metode utilizate şi animale de experienţă
    - efecte farmacologice importante
    - efecte adverse previzibile
    - doză letală la 50% din animalele pe care s-a efectuat testarea
    - comparaţii calitative cu alte produse cu aceleaşi efecte

III. Dosarul toxicologic preclinic:

- Toxicitate acută
- Toxicitate cronică
- Toleranţă locală
- Cercetări speciale de toxicologie
- Efecte asupra reproducerii
- Efect cancerigen, mutagen, teratogen

Pe baza acestor trei dosare preclinice autorităţile sanitare decid dacă medicamentul poate fi testat pe om. O atenţie specială se acordă în cazul în care produsul medicamentos este testat pentru prima oară pe om (*first time in humans, FTIH studies*). Cele trei dosare, împreună cu Norma de calitate (controlul produselor) şi Monografia (descrierea ce se include în farmacopee) trebuie să permită controlul loturilor de materii prime, control produsului finit şi explorarea căilor de obţinere a materiilor prime şi a metodelor de fabricare mai eficiente. Spre finalul acestei etape are loc fabricarea loturilor pentru cercetarea clinică.

6. Înaintarea documentaţiei pentru medicamente inovatoare (*Investigational New Drug, IND Application*). Atunci când este cazul unui medicament inovator, documentaţia obţinută este organizată într-o aplicaţie pentru un nou medicament investigat care, conform cerinţelor autorităţilor va conţine următoarele:

- Formularul de aplicaţie către autoritatea competentă
- Planul general de investigaţii
- Broşura investigatorului
- Protocolul
- Datele chimice, de fabricaţie şi controlul calităţii
- Datele farmacologice şi toxicologice
- Datele privind administrarea la om

7. Cercetarea clinică (*clinical research*) se desfăşoară în cadrul studiilor clinice (*clinical trials*). Un studiu clinic este un proiect de cercetare care determină eficacitatea, tolerabilitatea şi siguranţa medicamentului candidat care va deveni un nou medicament. Studiile implică iniţial subiecţi voluntari umani sănătoşi, iar apoi pacienţi ce prezintă boala căreia i se adresează candidatul cercetat. Studiile clinice se desfăşoară numai în spitale, universităţi, cabinete sau clinici medicale acreditate pentru activitatea de cercetare. Simultan desfăşurării cercetărilor clinice se face trecerea de la producţia pilot la producţia pe scară largă şi sunt produse industrial primele loturi ale medicamentului. Se perfectează metodele tehnologice prin testare şi validare.

Etapele unui studiu clinic:

A. Studii clinice în faza I *(phase I clinical trials*) se desfăşoară pe efective de 20-100 de voluntari sănătoşi pentru a aduna informaţii despre siguranţă, efecte adverse şi un interval sigur al dozajului.

B. Studii clinice în faza II *(phase II clinical trials*) înrolează efective de 100-500 de voluntari (subiecţi susceptibili sau care manifestă boala căreia i se adresează noua terapie) pentru a evalua eficacitatea medicamentului, de regulă comparativ cu un compus placebo (pe **cohorte** de subiecţi/pacienţi), şi pentru a aduna informaţii despre siguranţă (stabilirea efectelor secundare).

C. Studii clinice în faza III *(phase III clinical trials*) se desfăşoară pe efective de 1.000-5.000 de voluntari cu scopul de a confirma eficacitatea medicamentului, de a monitoriza efectele secundare, de a compara efectele cu cele ale altor medicamente similare şi de a colecta informaţii pentru o administrare în condiţii de siguranţă a pacienţilor. Studiile din această fază sunt studii clinice controlate (comparate cu un standard, care este fie un placebo, fie un alt produs medicamentos existent de piaţă).

D. Studii post marketing *(post-marketing studies)* vizează utilizarea terapeutică (atât preautorizare cât şi postautorizare). Sunt tot studii controlate, conduse în acord cu condiţiile descrise în autorizaţia de punere pe piaţă. Se urmăreşte evaluarea eficacităţii, reacţiile adverse pe termen lung şi farmacocinetica specifică.

8. Înaintarea documentaţiei către autorităţi (*submission to regulatory agencies*) în scopul obţinerii licenţei de scoatere pe piaţă. Preliminar demarării studiului clinic se înaintează autorităţilor din ţările unde se testează medicamentul documentaţia în scopul obţinerii aprobării, iar în cadrul fiecărui studiu se pregăteşte documentaţia conţinând evidenţe în ceea ce priveşte eficacitatea, tolerabilitatea, siguranţa şi imunogenicitatea (în cazul vaccinurilor şi al medicamentelor bazate pe proteine).

9. Lansarea medicamentului spre comercializare (*drug marketing*) este condiţionată de obţinerea brevetului de invenţie şi a autorizaţiilor necesare pentru producţie şi punere pe piaţă.

Din punct de vedere comercial, se disting trei etape în **ciclul de viață al unui nou medicament**:

I. Etapa de cercetare și dezvoltare, până la lansarea pe piață;
II. Perioada dintre lansare și pierderea exclusivității (de ex. expirarea brevetului de invenţie);
III. Perioada ulterioară pierderii exclusivității, când medicamentele generice pot intra pe piață.

Un studiu clinic este important prin scopul lui iniţial, acela de a demonstra calitatăţile terapeutice ale unor noi medicamente. Fără realizarea unor studii pe cohorte reprezentative nu pot fi obţinute date corecte şi măsurabile privind efectele terapeutice, indicaţiile şi reacţiile adverse. Odată parcurse toate fazele studiilor clinice, medicamentul poate fi aprobat, lansat şi prescris în condiţii de siguranţă. Un studiu clinic este important şi pentru prestigiul cercetătorilor şi a personalului medical care participă la realizarea lui, a ţărilor în care se desfăşoară, dar este cel mai important pentru pacienţii care urmează să beneficieze de medicamentul studiat. Cercetarea clinică se realizează în principal în ţările dezvoltate deoarece condiţiile de desfăşurare sunt foarte stricte şi implică o pregătire specială pentru medici/cercetători şi foarte multă seriozitate din partea pacienţilor. Aceste cercetări se bazează pe o disciplină a investigatorilor dar şi a pacienţilor în ceea ce priveşte respectarea tuturor regulilor impuse privind administrarea medicaţiei şi colectarea rezultatelor.

În iniţierea, demararea, realizarea, închiderea şi publicarea unui studiu clinic sunt implicaţi numeroşi factori de decizie şi multiple echipe ce execută sarcini prestabilite:

- Sponsor
- Manager Cerectare – Dezvoltare (*Clinical Research & Development Manager*)
- Manager al studiului (*Global Study Manager*)
- Siguranţă (*Safety*)
- Farmacovigilenţă (*Pharmacovigilence*)
- Reglementare (*Regulatory Affairs*)
- Statistică (*Statistical*)
- Întocmire şi redactare documentaţie (*Scientific Writing*)
- Monitorizare studii (*Clinical Research Associates*)
- Investigatori (*Investigators*) şi personal medical din centrele de desfășurare a studiului
- Publicare, diseminare (*Publishing, Web Disclosure, Publication Writing*)
- Arhivare (*Archiving*)

Concepţia şi caracterizarea anchetelor permit o **clasificare a studiilor clinice** în funcţie de diferite criterii. După obiectivul urmărit, studiile clinice pot fi:

- **Descriptive** – emit ipoteze prin colectarea datelor la nivel de populaţie sau indivizi;
- **Analitice** – demonstrează ipotezele, fie observaţional fie experimental.

După relaţia temporală dintre iniţierea studiului şi efectul studiat:

- **Prospective** – se bazează pe o colecţie de date de expunere (date de referinţă) de la subiecţi recrutaţi înainte de dezvoltarea rezultatelor de interes. Metodele de monitorizare includ interviuri telefonice, interviuri față în față, examinări fizice, teste medicale/de laborator și chestionare online sau trimise prin poştă;
- **Retrospective** – se identifică expunerea în trecutul subiectului şi adună rezultate folosind arhive şi date istorice.

După direcţia temporală, studiile clinice sunt concepute ca:

- **Anchete transversale** (*cross-sectional study*) – studiile de prevalenţă sau cele ecologice măsoară rezultatul şi expunerea simultan, într-o populaţie bine definită, permiţând măsurarea forţei asociaţiei epidemiologice exprimate prin raportul cotelor (*odds ratio*);
- **Anchete longitudinale** – implică observaţia continuă şi repetată a aceleiaşi variabile pentru o anumită perioadă de timp. Pot include anchete transversale repetate, studii prospective sau retrospective.

Din punct de vedere al administrării unui medicament, studiile clinice pot fi:

- **Intervenționale sau experimentale –** studii prospective care presupun alocarea pacienţilor la două sau mai multe grupuri de tratament şi respectiv de control;
- **Neintervenţionale sau observaţionale** – studii care presupun observarea pacienţilor, se desfăşoară prospectiv sau retrospectiv, şi în care metoda de studiu nu îşi propune să altereze sau să influenţeze comportamentul pacientului sau al practicianului.

În general, selecţia subiecţilor şi alocarea tratamentui se realizează prin **randomizare** (alocare întâmplătoare asistată de computer). Randomizarea este o tehnică care se foloseşte cu scopul de **scădere a erorii sistematice (*bias*)**. Orice factor care distorsionează natura adevărată a unui eveniment sau a unei observaţii, influenţând rezultatele, poartă numele de *bias*. În investigaţiile clinice, *bias* reprezintă orice factor sistematic, altul decât cel investigat (medicamentul testat), care modifică magnitudinea diferenţei observate între rezultatele obţinute în grupul de tratament şi respectiv în grupul martor. *Bias*-ul micşorează acurateţea (nu în mod obligatoriu şi precizia) unei observaţii. Bias-ul se referă de asemenea şi la punctul de vedere prejudiciat sau parţial al unui investigator/cercetător, şi poate afecta interpretarea. Tehnica dublu orb (*double blinded*) este cel mai des folosită pentru a diminua acest *bias*.

Studiile clinice pot fi concepute şi din punct de vedere al transparenţei alocării tratamentului, definit de **conceptul de *blinding***:

- **Studiul deschis** (*open study*) este acela în care şi investigatorul şi pacientul cunosc tratamentul alocat;
- **Studiul orb** (*blind study*) se foloseşte în studiile clinice unde alocarea în grupul de control sau de tratament nu este divulgată pacienţilor şi / sau investigatorilor.

Această tehnică elimină posibilitatea ca răspunsul pacientului la tratament sau comportamentul investigatorului să se modifice în funcţie de alocare şi să afecteze rezultatele studiului. Metoda nu poate fi practicată întotdeauna (ex. când se administrează medicamente cu formulare diferită, când se compară un tratament medicamentos cu unul chirurgical), dar ar trebui folosită ori de cate ori este posibil şi este compatibilă cu îngrijirea optimă a pacientului. Un studiu **simplu orb** este cel în care grupul de alocare este ascuns numai pacientului; un studiu **dublu orb** este cel în care nici pacienţii nici investigatorii nu cunosc cărui grup au fost alocaţi voluntarii din studiu.

Studiile clinice pot fi concepute ca:

- **Anchete de cohortă** (*cohort study*), ce dovedesc existenţa şi măsoară forţa unei asociaţii epidemiologice într-un grup de subiecţi care au o caracteristică definitorie, permiţând generalizări de tip cauzal;
- **Anchete caz-martor sau caz-control** (*case-control study*) studiază siguranţa şi eficacitatea substanţei terapeutice, dovedesc asociaţii epidemiologice, verifică validitatea unor ipoteze pe două loturi de subiecţi: lotul cazurilor şi lotul martor. Pot include în vederea comparării bolnavi / non-bolnavi, subiecţi expuşi / neexpuşi etc. Presupune administrarea tratamentului experimental în grupul cazurilor şi administrarea altui tratament existent, administrarea medicaţiei placebo sau neadministrarea vreunui tratament în grupul martor.

La conceperea unui studiu clinic sunt evaluate avantajele şi dezavantajele fiecărui tip de design, optimizându-se obţinerea de date relevante prin prognoză statistică. **Cel mai simplu, mai puţin costisitor şi mai bogat în rezultate este studiul controlat, randomizat, dublu orb şi cu grupuri paralele.**

Documentaţia studiului clinic. Studiile clinice desfăşoară activităţi cu scopul obţinerii de rezultate cu un înalt grad de acurateţe şi credibilitate. **Drepturile, siguranţa şi confidenţialitatea** subiecţilor participanţi în cercetarea clinică sunt respectate şi protejate. Studiile clinice se **planifică detaliat pentru perioade de zeci de ani**, specificându-se precis calendarul ce conţine datele de începere sau finalizare a diverselor etape. Respectarea acestor termene este esenţială întrucât anumite procese fie decurg unele din altele, fie trebuie să survină la intervale reglementate legal. Orice întârziere de o zi poate atrage după sine costuri uriaşe generate de rectificarea documentelor, penalităţi din partea autorităţilor şi chiar riscul invalidării studiului clinic. Două astfel de termene au o importanţă specială: înrolarea primului subiect (*first subject first visit*) şi colectarea datelor de la ultimul voluntar (*last subject last visit*). Întrucât studiile se desfăşoară în unul sau mai multe centre din una sau mai multe ţări, datele personale ale pacienţilor (date de identificare personală, date medicale etc) circulă prin sisteme informatice securizate.

Documentaţia care se întocmeşte în cadrul unui studiu clinic include următoarele:

- **Protocol** – document care descrie obiectivele, proiectul, metodologia, aspectele statistice și organizarea unui studiu clinic. Termenul înglobează versiunile succesive ale protocolului și modificările acestuia;
- **Consimțământ informat** (*informed consent form*) – document de înrolare a subiecţilor ce conţine exprimarea în mod liber și voluntar de către un subiect a voinței sale de a participa într-un anumit studiu clinic, după ce a fost informat cu privire la toate aspectele legate de studiul clinic care

sunt relevante pentru decizia subiectului privind participarea sau, în cazul minorilor și al subiecților aflați în incapacitate, un acord din partea reprezentantului legal privind participarea la studiul clinic;

- **Broșura investigatorului** (*investigator's brochure*) – culegere de date clinice și non-clinice privind medicamentul desemnat pentru investigație clinică, care sunt relevante pentru studiul acestor medicamente în cazul utilizării la om;
- **Manual de procedură a studiului** (*study procedure manual*) – toate informaţiile şi indicaţiile necesare personalului la centrele de desfăşurare a studiului;
- **Formular de raportare a cazului** (*case report form, CRF, eCRF*) – fişa în care se documentează toate informaţiile care se colectează conform protocolului, la nivel individual, inclusiv despre efecetele adverse;
- **Raport statistic** (*statistical report*) – centralizarea rezultatelor studiului şi analiza statistică a acestora;
- **Raport al studiului clinic** (*study report*) – raport privind studiul clinic prezentat într-un format ușor accesibil, elaborat în conformitate cu reglementările în vigoare, și care poate însoți o cerere pentru autorizația de lansare pe piață, daca este cazul.

Documentul central care guvernează desfăşurarea studiului şi stabileşte toate activităţile derulate în cadrul unui studiu clinic este **protocolul**. În protocol sunt prezentate informaţii privind: scopul cercetării, condiţiile privind includerea pacienţilor în studiu, programarea alocării medicamentului şi eventual a testelor, metodele şi tratamentele, dozajele, perioada pe care se desfăşoară studiul şi metodele de raportare. De asemenea, precizează modul în care se va realiza testarea ipotezei, adică modalitatea de analiză şi interpretare a rezultatelor studiului. Aceasta implică stabilirea probabilităţii ca observarea unui efect la tratament să fi apărut numai datorită întamplării, dacă ipoteza specificată se dovedeşte adevărată. De regulă se testează ipoteza nulă, care este formulată înainte de începerea sudiului şi presupune că intervenţia din studiu nu are un efect real / adevărat. Testarea ipotezei prin derularea unor teste de semnificaţie se foloşeste pentru a determina dacă ipoteza nulă este sau nu respinsă. În acest scop se realizează în prealabil un **plan de analiză statistică** (*statistical analysis plan*), care precizează clar detalii despre alocarea subiecţilor, colectarea şi analiza datelor, metodele de interpretare statistică şi raportare a rezultatelor, criteriile statistice (puterea studiului, dimensiunea grupurilor analizate, gradul de incertitudine). Semnificaţia statistică, magnitudinea efectului şi numărul pacienţilor înrolaţi în grupuri/cohorte sunt luate în calcul pentru a defini puterea studiului, la un anumit interval de confidenţă a rezultatelor. De asmenea, protocolul trebuie să prezinte clar **criteriile de includere şi excludere** a pacienţilor în studiu, precum: vârsta, tipul şi severitatea afecţiunii, istoricul medical, starea medicală la momentul înrolării. Voluntarii incluşi în studiu beneficiază de un examen medical amănunţit care poate include şi diverse analize medicale.

Consimţământul informat al subiectului cuprinde detalii despre studiu şi terapia studiată, incluzând: motivul pentru care se desfăşoară studiul, obiectivul, modul de desfăşurare, perioada de timp, riscurile implicate şi beneficiile aşteptate. Înainte de semnarea consimţământului informat se oferă toate clarificările necesare pentru ca subiecţii să le poată evalua şi să decidă participarea lor în studiu. Subiecţii se pot retrage din studiu oricând. Participanţii sunt informaţi în prealabil asupra medicaţiei administrate, inclusiv a medicaţiei de tip placebo.

Monitorizarea progresului în studiile clinice este realizată de specialişti ce supraveghează siguranţa medicamentului şi probabilitatea apariţiei efectelor adverse. Acestea pot include efecte secundare datorate medicaţiei sau de alt tip (interacţiuni medicamentoase), sau evenimente diverse care ar putea sau nu să aibă legătură cu compusul candidat (cum ar fi de exemplu o răceală, o fractură etc). La sfârşitul studiului, medicul evaluează probabilitatea ca medicamentul investigat să fi cauzat efectele adverse şi realizează o clasificare de posibil / probabil / improbabil. Majoritatea studiilor permit pacientului să ia şi alte medicaţii standard pentru tratarea unor afecţiuni existente sau apărute pe durata studiului: antihipertensive, antibiotice, atipiretice, antiinflamatoare etc. Aceste decizii sunt luate însă doar împreună cu medicul investigator, pentru a nu intra în conflict cu protocolul studiului.

Beneficiile şi riscurile participării sunt menţionate în formularul de consimţământ informat şi sunt explicate subiecţilor înainte de înrolare. Beneficiul primar al participării într-un studiu clinic este accesul la un tratament nou şi posibil eficient. Totuşi, tratamentul s-ar putea să nu fie eficient pentru anumite persoane, s-ar putea să dureze mult până să apară rezultatele pozitive sau ar putea să aibă efecte secundare care să nu poată fi tolerate de participant. Pe lângă accesul la terapia inovativă, participarea într-un studiu clinic ajută societatea, prin contribuţia la cercetarea medicală şi dezvoltarea de noi tratamente mai sigure şi mai eficiente utile pentru o întreagă comunitate de pacienţi.

Ca recomandări înainte de înrolarea într-un studiu clinic, este important să fie consultat medicul de familie şi să fie luate în considerare următoarele:

- Care sunt drepturile şi obligaţiile participantului într-un studiu clinic?
- Subiectul voluntar va plăti ca să participe în studiul clinic?
- Voluntarul va primi compensaţii pentru participare?
- Ce fel de tratamente, proceduri şi/sau teste se vor administra în timpul testării? Vor fi dureroase sau inconfortabile?
- Cât va dura testarea?
- Participantul poate urma tratamentul obişnuit (dacă este cazul) pe perioada testării? Ce tratamente, proceduri sau medicamente trebuie evitate în timpul studiului?
- Care sunt riscurile şi beneficiile pe termen scurt, intermediar şi lung?
- Subiectul poate rămâne la acest tratament şi după ce se termină testarea?

Raportul studiului clinic integrează într-un singur document descrierea, prezentarea şi analiza clinică şi statistică, realizând o prezentare a studiului clinic efectuat pe subiecţi umani, cu sau fără administrarea unui produs în scop terapeutic, profilactic sau de diagnostic. Raportul prezintă obiectivele studiului, planul investigaţional cu eventualele deviaţii, datele demografice, rezultatele eficacităţii, siguranţei şi imunogenicităţii, după caz, şi respectiv concluziile studiului clinic, anexând toate documentele relevante generate pe durata studiului.

Date despre studiile clinice conţinute în protocol, cât şi rezultatele studiilor clinice devin publice. Pe lângă site-urile companiilor farmaceutice, principalele domenii web unde se înregistrează şi se diseminează informaţiile din studii clinice sunt:

www.clinicaltrials.gov
https://eudract.ema.europa.eu/
www.clinicalstudyresults.org

www.ISRCTN.org
www.trialregister.nl
http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/

Datele esenţiale ale cercetărilor efectuate asupra noului medicament, în timpul perioadei de concepere şi formulare privitoare la studiile tehnologice şi analitice, de farmacocinetică şi biodisponibilitate, posologia stabilită în funcţie de limitele terapeutice, considerente tehnologice şi economice precum şi rezultatele studiilor clinice se centralizează în patru dosare: cele trei dosare preclinice (farmaceutic, farmacologic, toxicologic) şi dosarul clinic. Prin urmare, rezultatele cercetărilor clinice sunt incluse în **dosarul clinic**, care conţine datele testelor clinice, informaţii despre efectele terapeutice, mecanismul de acţiune şi efectele adverse ale medicamentului candidat.

Împreună cu cele trei dosare preclinice, dosarul clinic este înaintat autorităţilor. Rezultatele studiilor de cercetare şi dezvoltare a unui nou medicament conduc în final la stabilirea formulei definitive a noului medicament, obţinerea brevetului de invenţie, obţinerea autorizaţiei de fabricaţie şi de introducere în terapie. Cercetarea şi dezvoltarea medicamentelor, desfăşurarea studiilor preclinice şi clinice se realizează în conformitate cu legislaţia şi ghidurile de bună practică în vigoare.

3.2. Reglemetări legale

Pentru a putea fi demarat în România, un studiu clinic are nevoie de aprobarea a două foruri naţionale: **Agenţia Naţională a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale** (ANMDM) şi **Comisia Naţională de Bioetică a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale** (CNBMDM). Legislaţia care guvernează derularea studiilor clinice este bazată pe un set de reglementări numite **Reguli de Bună Practică în Studiul Clinic** (*Good Clinical Practice,* GCP), conform principiilor *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP) din cadrul *European Medicines Agency* (EMA) şi ale *International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Acestea asigură protecţia drepturilor, siguranţa şi starea de bine a voluntarilor sau pacienţilor incluşi în studiu.

Reglementări internaţionale:

1. Declaraţia pentru drepturile omului de la Helsinki, modificată;
2. Ghidul GCP, conform principiilor CHMP şi ale ICH.

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) este comitetul EMA responsabil pentru medicamentele destinate uzului uman. CHMP joacă un rol vital în autorizarea medicamentelor în Uniunea Europeană. În cadrul procedurii centralizate, CHMP este responsabil de:

- Evaluarea inițială a cererilor de autorizație de introducere pe piață;
- Evaluarea modificărilor sau extensiilor la o autorizație existentă;
- Emiterea de recomandări către Comisia Europeană pentru modificări ale autorizației de introducere pe piață a unui medicament, suspendarea sau retragerea acestuia de pe piață, atunci când este necesar.

De asemenea, CHMP evaluează documentaţia medicamentelor autorizate la nivel naţional, trimisă către EMA pentru o poziție armonizată în întreaga UE. În plus, CHMP și grupurile sale de lucru contribuie la dezvoltarea medicamentelor și a reglementării medicamentelor, prin:

- Furnizarea de consiliere științifică companiilor care cercetează și dezvoltă noi medicamente;
- Pregătirea ghidurilor științifice și a ghidurilor de reglementare pentru a ajuta companiile farmaceutice să pregătească cereri de autorizație de introducere pe piață pentru medicamentele umane;
- Cooperarea cu parteneri internaționali în ceea ce privește armonizarea cerințelor şi reglementărilor legale.

International Conference of Harmonization of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) este o organizaţie internaţională creată pentru a aduce o armonizare a aspectelor ştiinţifice şi tehnice a înregistrării medicamentelor pe plan mondial. A fost înfiinţată în aprilie 1990 la întâlnirea reprezentanţilor agenţiilor de reglementare şi a asociaţiilor industriale din UE, Japonia şi SUA. Ultimele modificări în structura ICH au fost aplicate în anul 2015, iar în prezent organizaţia include 17 membri şi 32 de observatori internaţionali. Membri fondatori ai ICH: *European Commission of EU*, *European Federation of Pharmaceutical Industries' Associations*, *Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan*, *Japan Pharmaceutical Manufacturers Association*, *US FDA*, *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*. Observatori în cadrul ICH: *WHO*, *International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Association.* ICH a evoluat spre a face faţă dezvoltării globale a industriei farmaceutice, în scopul armonizării internaţionale, emiţând ghiduri ce servesc siguranţa, eficacitatea şi înalta calitate a produselor farmaceutice.

European Medicines Agency este un organism descentralizat al UE, cu sediul la Londra, care are resposabilitatea de a asigura respectarea sănătăţii publice şi a sănătăţii animalelor prin evaluarea şi supervizarea medicamentelor de uz uman şi veterinar. EMA este răspunzatoare de evaluarea ştiinţifică şi aprobarea pentru comercializare a medicamentelor în Uniunea Europeană printr-o procedură centralizată. Companiile care obţin autorizaţia de introducere pe piaţă a produselor lor după evaluarea de către EMA, pot comercializa aceste produse în UE şi statele EEA EFTA (Islanda, Liechtenstein şi Norvegia). Toate **produsele medicale de uz uman şi veterinar obţinute prin biotehnologii sau alte procese biotehnologice trebuie sa fie aprobate prin procedura centralizată** pentru a putea fi comercializate. De asemenea EMA monitorizează constant siguranţa medicamentelor aflate pe piaţă prin reţeaua de farmacovigilenţă şi ia măsurile necesare de **interzicere a comercializării atunci când efectele adverse ale unui medicament depăşesc beneficiile sale terapeutice şi pun în pericol sănătatea şi viaţa pacienţilor**. Agenţia concentrează resursele ştiintifice a 40 de autorităţi competente naţionale din 30 de ţări membre UE (printre care şi ANMDM România) şi ţările EEA EFTA, adică peste 4.000 de experţi europeni. EMA contribuie la colaborările internaţionale UE de colaborare cu Farmacopeea Europeană, WHO, ICH etc.

Promovarea dezvoltării și comercializării biofarmaceuticelor obţinute prin tehnologii avansate pentru terapii genetice şi celulare necesită finanţare, dar şi claritate și armonizare a reglementării. Schema de finanţare ***Innovative Medicines Initiative*** a UE colaborează cu ***European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*** (EFPIA) pentru identificarea ariilor

strategice, realizând investiţii în tehnologii promiţătoare emergente. Platforme precum *PRIME,* ***Priority Medicines*** a EMA, ***Breakthrough Therapy* şi *Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation*** a FDA au fost create pentru a susține un astfel de efort prin consiliere ştiinţifică şi evaluare accelerată. Implementarea lor vizează medicamentele prioritare, obţinute prin tehnologii de ultimă generaţie, cu dovezi clinice care indică potenţial în tratarea unor boli grave care nu dispun de tratament sau care oferă avantaje terapeutice comparativ cu produsele existente.

Agenţia Naţională a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale din România are misiunea de a contribui la protejarea şi promovarea sănătăţii publice prin:

- Evaluarea documentaţiei de autorizare în vederea introducerii pe piaţă a unor medicamente destinate uzului uman sigure şi eficiente;
- Supravegherea siguranţei medicamentelor de uz uman aflate în circuitul terapeutic prin activitatea de inspecţie şi farmacovigilenţă;
- Asigurarea pentru pacienţi şi personalul medico-sanitar a accesului la informaţii utile şi corecte;
- Asigurarea eficacităţii şi eficienţei administrative a instituţiei şi a transparenţei practicilor şi procedurilor utilizate.

Efectele secundare ale medicamentelor au început să fie studiate din anul 1952. Multe ţări au autorităţi ce monitorizează atent siguranţa pacienţilor şi eventualele reacţii: *Uppsala Monitoring Centre* al WHO*, European Medicines Agency* (EMA) a Uniunii Europene (UE), *Food and Drug Administration* (FDA) în SUA, *Therapeutic Goods Administration* în Australia etc. Siguranţa pacienţilor este atent monitorizată, iar în sistemul de farmacovigilenţă pacienții, cadrele medicale și companiile farmaceutice trebuie să raporteze toate efectele secundare suspectate la autoritatea de reglementare a medicamentelor din țara lor. În România, pe site-ul ANMDM există opţiunea de raportare directă online (https://www.anm.ro/medicamente-de-uz-uman/farmacovigilenta/raporteaza -o-reactie-adversa/). EMA realizează o monitorizare centralizată a siguranței medicamentelor pe tot parcursul ciclului lor de viață, transmite rapoarte Comisiei Europene şi actualizează anual lista medicamentelor de uz uman care fac obiectul unei monitorizări suplimentare. Informațiile despre efectele secundare raportate sunt disponibile publicului în baza europeană de date privind rapoartele despre reacțiile adverse suspectate la medicamente.

3.3. Medicamente biosimilare

Primele biofarmaceutice au intrat pe piaţă în anii 1970, iar ulterior numărul de brevete eliberate a crescut exponenţial. Odată cu expirarea numeroaselor brevete pentru produsele biologice de top, între anii 2012 și 2019, a crescut interesul pentru producția de produse farmaceutice biosimilare. Comparativ cu substanţele active din medicamentele generice tradiţionale, care sunt molecule mici, identice din punct de vedere al activităţii chimice, produsele biologice prezintă în general o complexitate moleculară ridicată. Datorită heterogenității și sensibilității ridicate a la modificările proceselor de fabricație, biofarmaceuticele biosimilare prezintă variabilitate faţă de cele originale. Totuși, siguranța și performanțele clinice atât ale medicamentului original, cât și ale biofarmaceuticelor biosimilare trebuie să rămână echivalente.

Încă din anul 2003, EMA a introdus o **platformă a produselor medicinale biologice similare**. În 2009, WHO a publicat *Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products*. Scopul acestei orientări este de a furniza o normă internațională pentru evaluarea produselor biosimilare cu un grad ridicat de similitudine cu un medicament de referință deja autorizat pentru medicina bioterapeutică. UE a fost prima care a dezvoltat un cadru legal și științific pentru aprobarea medicamentelor biosimilare. Între anii 2006 şi 2020, EMA a acordat autorizații de introducere pe piață pentru mai mult de 50 de produse, prima fiind somatropina biosimilară. Primul biosimilar al unui anticorp monoclonal aprobat la nivel mondial a fost cel al infliximabului din UE, în 2013. În anul 2009 a fost introdusă de către FDA reglementarea *Pathway for biosimilars act,* iar în 2015 a fost aprobat primul produs biosimilar în SUA, filgrastim-sndz (Zarxio, Sandoz). O listă a biofarmaceuticelor biosimilare aprobate în UE: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories %253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicine/field_ema_med_status/authorised36/ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar/search_api_aggregation_ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar

3.4. Medicamente orfane

Bolile rare ereditare sunt cauzate de mutații ale genelor ce apar cu o frecvenţă scăzută, de multe ori necunoscută, pentru multe dintre ele incidenţa fiind de sub 1:1.000.000 de persoane. Bolile rare sunt însă numeroase, se apreciază că peste 7.000 de boli rare afectează câteva sute de milioane de pacienţi, probabil 10% din populaţie (Mendell şi colab. 2021). Aşa-numitele medicamente orfane se folosesc pentru a trata boli care sunt atât de rare, încât sponsorii au rezerve să le dezvolte în condiţii obişnuite de marketing, deoarece dimensiunile reduse ale pieţii căreia se adresează nu permite companiilor farmaceutice să-şi recupereze capitalul investit în cercetare şi în dezvoltarea produsului. Pe de altă parte, pacienţii cu boli rare nu pot să nu beneficieze de progresele făcute de ştiinţă şi farmacoterapie, ei având aceleaşi drepturi la tratament ca orice pacient. Pentru a stimula cercetarea şi dezvoltarea în domeniul medicamentelor orfane, autorităţile publice au implementat stimulente pentru industria biotehnologiilor farmaceutice. Debutul a fost în anul 1983 în Statele Unite ale Americii cu adoptarea Actului Medicamentului Orfan, urmată de Japonia şi Australia în 1993 şi respectiv 1997. UE a urmat în anul 1999 prin implementarea unei politici comune privind medicamentele orfane în statele membre.

Regulamente Europene privind medicamentele orfane (Regulamentul EC 141/2000, EC 847/2000) stabilesc prevederile pentru aplicarea criteriilor de desemnare ca orfan, precum şi definirea conceptelor de „produs medicinal similar” şi „superioritate clinică”. Numai medicamentele pentru uz uman pot fi desemnate ca medicamente orfane. Prin urmare, termenul nu se referă la medicamente veterinare, dispozitive medicale, suplimente nutritive şi produse dietetice. Medicamentele desemnate ca orfane sunt incluse în **Registrul Comunitar pentru Produse Medicinale Orfane**.

Acordarea autorizaţiei pentru un medicament nu înseamnă că acesta este disponibil în toate ţările Uniunii Europene. Deţinătorul autorizaţiei de comercializare trebuie să decidă înainte statusul

comercializării în cadrul fiecărei ţări şi apoi medicamentul va urma procedurile necesare în fiecare ţară pentru a stabili condiţiile de decontare şi preţul său. În ciuda eforturilor reunite, heterogenitatea abordărilor în diferite ţări face ca accesul pacienţilor la medicamente orfane să fie mai complex şi uneori îngreunat de birocraţie. Descriere a politicii europene în domeniul bolilor rare şi al medicamentelor orfane poate fi găsită pe website-ul Comisiei Europene, iar lista de medicamente orfane disponibile în UE este actualizată lunar în reţeaua Orphanet. Orphanet mai asigură acces la informaţii privind medicamentele orfane în curs de dezvoltare (desemnate ca orfane şi trialuri clinice) sau deja disponibile pe piaţă, informaţii clasificate pe categorii de boli, tip de produs, nume de substanţă, nume de sponsor şi ţară. Lista medicamentelor orfane disponibile în UE: http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/list_of_ orphan_drugs_in_europe.pdf

3.5. Rentabilizarea dezvoltării de noi medicamente

Principalele dificultăţi în dezvoltarea medicamentelor sunt cele de timp îndelungat, costuri uriaşe şi rate de succes scăzute. Intervalul de timp necesar cercetării şi dezvoltării *de novo* a unui produs medicamentos este de 13-17 ani. În prezent, cheltuielile totale, incluzând aprobarea comercializării şi studiile post-marketing sunt estimate la 2,6 miliarde de dolari (DiMasi şi colab. 2016). Analiza datelor existente indică o dublare la fiecare nouă ani a costurilor asociate cercetării, dezvoltării şi introducerii pe piaţă a unui nou medicament (Scanell şi colab. 2012). Paradoxal, deşi progresele ştiinţifice, tehnologice şi manageriale ar trebui să sporească eficienţa în acest domeniu, dezvoltarea noilor medicamente ar putea deveni nesustenabilă din punct de vedere financiar. Productivitatea cercetării în sectorul farmaceutic a scăzut semnificativ în ultimele decenii, implicând termene mai lungi, costuri mai mari și rate mai mici de succes ale compuşilor candidat. Printre soluţiile practicate pentru a rentabiliza dezvoltarea de noi medicamente se identifică mai multe strategii.

1. **Repoziţionarea pentru noi indicaţii terapeutice** a medicamentelor aflate deja pe piaţă. Avantajul major al acestei abordări este că, pentru un medicament existent, sunt disponibile atât informații preclinice, cât și profiluri clinice (farmacocinetice, farmacodinamice și de toxicitate), reducându-se astfel riscul de dezvoltare. În consecință, compusul medicamentos poate intra rapid în studiile clinice de stadiu târziu (*late clinical studies*). În prezent, aproximativ 30% din medicamentele nou aprobate sunt medicamente repoziționate. Tehnica experimentală este depășită de cea computerizată, denumită „*in silico drug repurposing*" (Park 2019). Exemple de medicamente repoziţionate pentru noi indicaţii sunt multiple, cum ar fi:

- Acidul acetilsalicilic (analgezic, antipiretic, antiinflamator tradiţional, cunoscut sub denumirea comercială de Aspirină, a fost repoziţionat cu scopul inhibării agregării plachetare, ca Aspenter).
- În prezent, în terapia anti-COVID-19 sunt evaluate şi chiar utilizate câteva medicamente pentru care a fost observat un efect clinic pozitiv, fiind cercetate pentru indicaţie în infecţiile cu virusul SARS-CoV-2:

- Sulfatul de hidroxiclorochină (Plaquenil, Sanofi-Aventis) este un medicament antiinflamator indicat în tratamentul poliartritei reumatoide dar şi pentru prevenirea şi tratamentul atacurilor acute de malarie produsă de *Plasmodium* sp.;

- Lopinavir/Ritonavir (Mylan) reprezintă un complex antiretroviral prescris pentru controlul infecţiei cu HIV;
- Tocilizumab (RoActemra, Roche) este un anticorp monoclonal umanizat IgG1 anti-receptor uman al interleukinei-6 (IL-6), obţinut prin tehnologia ADN recombinat în celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), indicat în tratamentul poliartritei reumatoide;
- Remdesivir este un antiviral analog de nucleotide dezvoltat ca tratament pentru boala virală Ebola și infecțiile cu virusul Marburg;
- Azitromicina este un antibiotic cu acţiune antiinflamatoare;
- Fenofibratul este un compus hipolipemiant.

2. Identificarea de noi ţinte biologice. Analizând medicamentele inovatoare care au pimit aprobare de comercializare în anul 2018, 13 dintre acestea au mecanisme de acţiune ce nu sunt modulate de medicamentele existente anterior. Șase dintre noile ținte medicamentoase sunt din familii de proteine deja utilizate: kinaze (2), receptori cuplați cu proteina G, GPCR (1), enzime (2) și transportori (1). Patru medicamente bazate pe anticorpi monoclonali (mAb) vizează proteinele secretate (un factor de creștere, un factor de coagulare, o citokină și o peptidă neurotransmițător). Două proteine sunt de origine virală. Din perspectiva farmacoterapeutică, oncologia, tulburările hematologice și bolile infecțioase au câștigat fiecare câte trei ținte noi:

- Larotrectinib, primul medicament care vizează receptorul kinazelor tropomiozinei, este şi primul medicament aprobat ce a fost dezvoltat special pentru o indicație tumor-agnostică.
- Caplacizumab vizează factorul von Willebrand, fiind primul nanoanticorp (*single domain antibody* sau *nanobody*) care a primit aprobare pentru tratarea purpurei trombotice trombocitopenice dobândite.
- Ibalizumab, un anticorp monoclonal care vizează co-receptorul CD4 utilizat de HIV pentru a intra în celulele T, este primul produs biologic aprobat pentru infecția cu HIV (Ursu şi colab. 2019).

O țintă inovativă o reprezintă M^{pro}, o enzimă cheie a coronavirusurilor cu rol esențial în medierea replicării și transcrierii virale, ce a devenit astfel o țintă atractivă a medicamentelor anti-SARS-CoV-2. Un screening cu randament sporit pe 10.000 de compuși ca inhibitori ai M^{pro} a inclus medicamente aprobate, candidați la medicamente în studiile clinice și alți compuși activi farmacologic. Șase dintre acești compuși au inhibat M^{pro}, iar unul (ebselen) a prezentat, de asemenea, activitate antivirală promițătoare în testele celulare (Jin şi colab. 2020).

3. Dezvoltarea de noi tehnici pentru descoperirea ţintelor inovative. Tehnologia de editare genetică CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) va interveni pe viitor în multiple etape ale cercetării şi devoltării medicamentelor, accelerând întreg procesul:

- Pentru identificarea şi validarea ţintei terapeutice, tehnologia CRISPR-Cas permite identificarea funcţiei unor gene. Realizarea unor substituţii, deleţii, inversii precise conduce la modificarea informaţiei genetice într-un anumit locus şi implicit corecţia sau inactivarea funcţiei unei gene (*gene knock-in* şi respectiv *gene knock-out*).
- În HTS, facilitează generarea de celule cu mutaţii specifice, pentru identificarea compuşilor *hit*.

- Efectele terapeutice ale compuşilor *hit* sunt testate şi validate în linii de celule izogene precum celulele stem pluripotente induse, iar variabilitatea genetică asociată bolii este generată cu ajutorul CRISP-Cas.
- Identificarea şi optimizarea compuşilor *lead* implică tehnologia CRISPR-Cas pentru obţinerea modelelor celulare şi animale necesare studiilor profilelor ADME, de siguranţă şi toxicologie (Scott 2018; Enzmann şi Wronski 2019).

4. BIOPROCESE CU IMPLICAŢII ÎN INDUSTRIA FARMACEUTICĂ

Cunoaşterea ştiinţifică şi strategia de dezvoltare economică actuală implică o nouă abordare a fenomenelor, acestea conducând la o adevărată revoluţie biotehnologică. În viitor, cea mai mare parte a industriei farmaceutice se va baza pe produsele biologice şi biotehnologice obţinute atât prin procedee de fermentaţie, cât mai ales prin metode specifice ingineriei genetice şi biologiei moleculare, acestea imprimând un salt tehnologic corespunzător. Printre cele mai importante aplicaţii ale biotehnologiilor farmaceutice se numără biosinteza de antibiotice, vitamine, aminoacizi, steroizi de semisinteză, substanţe antivirale, antiparazitare, antitumorale sau agenţi antihiperlipidici. Acestea fac parte din biotehnologia tradiţională. În ultimii ani au fost dezvoltate aplicaţii ale biotehnologiilor moderne, care utilizează metodele ingineriei genetice şi recombinării proteinelor în scopul realizării unor substanţe proteice biologic active, precum hormoni, proteine sangvine, imunoregulatori şi imunomodulatori. Ingineria genetică este considerată a fi tehnica ideală capabilă să amelioreze cantitativ şi calitativ capacitatea de biosinteză a microorganismelor, celulelor animale sau vegetale, în scopul obţinerii unor produse utile.

Tehnologia de fabricație pentru biofarmaceutice poate fi împărțită în procese derulate în amonte și în aval. **Procesarea în amonte** este definită de creșterea microbiană necesară pentru a produce biomolecule și implică selectarea liniei celulare, a mediului de cultură, a parametrilor de creștere și optimizarea procesului pentru a realiza condiții optime creșterii celulelor și producției biofarmaceutice. Scopul principal al procesării în amonte este transformarea substratului în produsele metabolice dorite. Aceasta necesită condiții controlate și implică utilizarea bioreactoarelor, luându-se în considerare factori precum tipul procesului (lot, în şarje, continuu etc) temperatura, pH-ul, oxigenarea, sterilizarea materialelor și echipamentelor utilizate și menţinerea condiţiilor pentru prevenirea contaminării.

Prelucrarea în aval include toate etapele necesare pentru purificarea biomoleculei din mediul de cultură sau linia celulară producătoare şi implică mai mulți pași pentru a captura biomolecula țintă și pentru a elimina impuritățile legate de celula gazdă (proteinele microorganismului producător sau ale celulei gazdă, ADN etc), impuritățile legate de proces (tampon, liganzi, antispumant etc) și impuritățile legate de produs (agregate, fragmente etc). Fiecare etapă de purificare este capabilă să îndepărteze una sau mai multe clase de impurități. Procesarea în aval cuprinde de obicei trei etape principale:
A. Recuperarea inițială (extracție sau izolare);
B. Purificarea (îndepărtarea majorității contaminanților);
C. Finisarea (eliminarea contaminanților specificați și a formelor nedorite ale biomoleculei țintă care pot s-au format în timpul izolării și purificării) (Jozala şi colab. 2016).

Tehnicile prin care celulele procariote sau eurcariote sunt exploatate în practica biotehnologică sunt grupate în două mari categorii de bioprocese:

1. **Procese fermentative** – implică activitatea culturilor de celule, în care fazele de creşere sunt în corelaţie directă cu activitatea metabolică, din catabolismul substratului şi din anabolism rezultând biomasa, precum şi o serie de metaboliţi primari şi secundari;
2. **Procese de bioconversie (biotransformare)** – celulele active din biomasă sau enzimele produse de acestea participă la conversia substratului, în calitate de biocatalizatori. Produşii intermediari sau finali ai biotransformărilor se numesc **bioderivaţi**.

Metaboliţii primari rezultaţi în urma metabolismului primar sunt compuşi cu greutate moleculară redusă şi structură simplă. Au rol esenţial în asigurarea creşterii, multiplicării şi condiţionează activitatea fiziologică celulară. În condiţii biotehnologice sunt sintetizaţi în cursul trofofazei (faza de multiplicare exponenţială), în cantităţi direct proporţionale cu biomasa. Sinteza este echilibrată, iar superproducţia metaboliţilor primari este caracteristică tulpinilor industriale. Exemple: aminoacizi, vitamine, nucleotide, acizi organici, enzime, alcooli.

Metaboliţi secundari (idioliţi) sunt sintetizaţi în decursul idiofazei (faza staţionară), fiind compuşi cu structură chimică variată ce asigură celulelor active protecţie în condiţii de stres. Exemple: antibiotice, alcaloizi, toxine, anticorpi, agenţi imunomodulatori şi antitumorali, hormoni de creştere.

Bioderivaţii (produşii de bioconversie) sunt produşi intermediari sau finali ai unor succesiuni de reacţii biochimice, catalizate de enzime sau desfăşurate în celule active enzimatic, libere sau imobilizate. Se caracterizează prin specificitate ridicată, determinând transformări ale unor compuşi cu structură chimică definită. Exemple: antibiotice de semisinteză, steroizi biotransformaţi, compuşi noi activi din punct de vedere farmacologic, utilizaţi în tratamentul maladiilor grave.

Biotehnologia poate interveni într-o singură etapă a unei căi de sinteză chimică, sau poate înlocui o succesiune de sinteze chimice printr-un singur proces fermentativ sau de bioconversie. Introducerea unor etape biotehnologice în diagrama de flux a unor sinteze chimice este justificată de reducerea semnificativă a costurilor de prodicţie dar şi a poluării mediului. Spre exemplu, producerea riboflavinei (vitaminei B2) în sistem clasic presupune combinarea a opt etape de sinteză chimică cu biosinteza. Obţinerea riboflavinei cu ajutorul ascomicetelor *Ashbya gossipii* şi *Eremothecium ashbyii*, pe cale fermentativă, într-o singură fază, nu doar că a simplificat procesul dar a condus la un randament sporit şi la scăderea costurilor de producţie cu 40%.

Principalele componente ale unui bioproces sunt: agentul biologic, substratul, produsul rezultat, aparatura şi metodele utilizate.

Numărul agenţilor biologici utilizaţi în bioprocese este în continuă creştere: microorganisme (bacterii, fungi, protozoare, virusuri, bacteriofagi), componente celulare (membrane, protoplaşti, enzime intracelulare), produse extracelulare (enzime, coenzime). De actualitate sunt celulele vegetale şi animale, microorganismele extremofile, organismele anaerobe, organismele recombinate, consorţiile de microorganisme, agenţii biologici imobilizaţi. Agenţii biotehnologici utilizaţi în bioconversia substrat-produs sunt în principal microorganismele de tipul bacteriilor şi al micromicetelor. Pentru realizarea unui bioproces, este extrem de importantă concordanţa dintre alegerea agentului biologic şi principiul tehnologic. În elaborarea biotehnologiei se parcurg următoarele etape:

1. Izolarea tulpinilor de microorganisme / liniilor celulare;
2. Selecţia tulpinilor / celulelor cu productivitate maximă;
3. Cultivarea pe un mediu adecvat;
4. Izolarea produsului de biosinteză;
5. Stabilirea structurii şi a spectrului de utilizare.

Sistemele de cultură ale microorganismelor pot fi:

A. Culturi în sistem închis: inocularea în mediu lichid urmată de creşterea microorganismului, fără suplimentarea ulterioară a substratului sau a culturii. Curba de creştere a microorganismului va înregistra cinci faze: lag, creştere exponenţială, staţionară, declin şi supravieţuire. Caz particular: diauxia.

B. Culturi continue: realizate în sistem dinamic, cu volum constant asigurat prin suplimentarea nutrienţilor şi îndepărtarea microorganismelor ajunse în faza de creştere logaritmică. Densitatea populaţiei microbiene şi rata de creştere a culturii sunt controlate.

Faza de biosinteză propriu-zisă se realizează în echipamente speciale, numite bioreactoare sau fermentatoare. Proiectarea fermentatorului previne contaminarea dar permite aprovizionarea cu nutrienţi şi evacuarea efluentului, din care se va obţine produsul final, în condiţi controlate. Frecvent bioreactoarele sunt prevăzute cu sistem de aerare şi cu sisteme de agitare.

4.1. Etapele biosintezei

Elaborarea şi industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcurgerea mai multor faze ce pornesc de la cercetările la nivel de laborator, urmate apoi de cele de la nivelul pilotului și, în final, la nivel industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedeului de biosinteză de la o fază la alta, cu optimizarea procesului de biosinteză.

I. Faza de laborator Cercetările de obţinere a unui produs prin biosinteză încep cu lucrări de laborator care constau în: izolarea și selecția microorganismelor / organismelor de interes; întrețierea tulpinilor / liniilor celulare cu proprietățile dorite; conservarea microorganismelor / celulelor producătoare şi realizarea culturilor inocul.

Izolarea şi selecţia de microorganisme noi sau cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai compusului ce urmează a fi biosintetizat. Tehnicile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism, tradiţionale fiind tehnica diluţiilor şi tehnica granulelor de sol. Microorganismele preluate din diferite habitate sunt cultivate pe medii solide sau lichide, astfel încât să se evidenţieze prin caracteristici fiziologice. În prima etapă se urmăreşte realizarea unei culturi pure prin tehnici microbiologice specifice (epuizarea ansei, diluţii succesive), după care se stabileşte o metodă de triere adecvată scopului urmărit. De obicei, microorganismele sunt cultivate în plăci Petri, pe medii solidificate cu agar-agar. Mai nou s-au dezvoltat aplicaţii îmbunătăţite pentru izolarea microorganismelor viabile dar necultivabile (VBNC) şi metode de screening cu randament sporit (HTS).

Întreţinerea tulpinilor producătoare. După faza de izolare şi selecţie, tulpinile pure se supun unor teste de caracterizare după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice sau

toxicologice. Tulpina astfel caracterizată se înregistrează într-o colecţie de microorganisme, în vederea protejării sale și a utilizării ulterioare. Ţinând cont că scopul este de a obține un anumit produs la nivel industrial, este necesar ca nivelul biosintezei să fie ridicat. De aceea se optimizează parametrii de biosinteză, iar tulpina producătoare poate fi supusă unor teste de ameliorare prin metode clasice (mutageneză) sau moleculare (inginerie genetică şi proteică).

Conservarea microorganismelor de interes, atât a tulpinilor parentale, cât şi a celor modificate genetic (mutante sau recombinate) se face prin liofilizare şi conservare în azot lichid. Tulpinile din colecţie utilizate în biosinteza curentă se păstrează sub diferite forme, cea mai frecventă fiind cultura stoc, de la care se iniţiază cultura inocul de laborator şi apoi se porneşte procesul de biosinteză. Cultura stoc este păstrată la frigider, pe mediu agarizat. Păstrarea pe termen lung la -80°C sau -170°C se realizează prin conservarea suspensiilor celulare în medii de cultură lichide, suplimentate cu agenţi crioprotectori (glicerol).

Realizare culturii de inocul. Inoculul reprezintă o cultură microbiană în curs de multiplicare pe un substrat nutritiv corespunzător şi în anumite condiţii specifice de dezvoltare (pH, temperatură, agitare, aerare). Inoculul constituie materialul de însămânţare al mediului de biosinteză propriu zis, din etapa următoare. Transferul culturii inocul în mediul de biosinteză se realizează în condiţii aseptice, după o perioadă de dezvoltare bine stabilită (vârstă, cantitate, aspect microscopic). În scopul biosintezei în laborator se utilizează fermentatoare care pot avea capacităţi de la 1 la 20 litri, în condiţii de sterilitate.

II. Faza de biosinteză pilot se realizează în bioreactoare, care pot avea diferite capacităţi (de la 20 la 500 litri). Faza de biosinteză este precedată de operaţii de sterilizare a aparaturii utilizate şi a mediului de cultură stabilit ca fiind optim, la nivel de laborator. Începutul fazei de biosinteză este considerat momentul transferului culturii inocul în mediul de cultură sterilizat şi răcit la temperatura de cultivare a microorganismului producător. Când raportul între capacitatea de inocul şi cantitatea de mediu de fermentaţie (numit raport de inoculare) nu permite pregătirea culturii inocul în laborator este necesară introducerea unei trepte intermediare de cultivare, denumite cultură intermediară.

În faza de staţie pilot, tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată şi optimizată pe instalaţii de biosinteză de capacitate medie. Pe baza datelor de cercetare obţinute la nivel pilot se elaborează procesul tehnologic pilot, după care urmează o fază de experimentare industrială şi apoi producţia propriuzisă a produsului urmărit (enzimă, antibiotic etc). Datele furnizate de tehnologia pilot elaborată constituie elemente de proiectare pentru instalaţiile industriale.

III. Faza de producţie industrială reprezintă etapa propriu-zisă a biosintezei, ce se realizează în bioreactoare de capacităţi mari (de la 100 la 100.000 litri), în condiţii optimizate în etapele anterioare. Principalele componente ale bioprocesului sunt atent monitorizate: agentul biologic, substratul, produsul rezultat, aparatura şi metodele utilizate.

Procesul industrial de obţinere a produselor de biosinteză reprezintă o succesiune a etapelor de prelucrare fizică şi biochimică a procesului biotehnologic. Succesiunea fazelor procesului biotehnologic:

A. Prima treaptă de prelucrare fizică presupune pregătirea şi sterilizarea mediului de cultură, sterilizarea utiljelor şi a aerului tehnologic;

B. Treapta de prelucrare biochimică este specifică biotehnologiei şi constă obţinerea produsului prin fermentaţie aerobă sau anaerobă;

C. A doua treaptă de prelucrare fizică presupune operaţii de separare a produsului obţinut. Operaţiile treptelor fizice sunt: dizolvarea, sterilizarea, extracţia, filtrarea, uscarea, adsorbţia, cromatografia etc

4.2. Bioprocese de fermentaţie

Termenul de fermentaţie este consacrat în biotehnologiile industriale, desemnând creşterea microorganismelor în medii de cultură în bioreactoare, cu scopul obţinerii unor produşi de interes. Sensul tehnologic nu se suprapune peste sensul fiziologic al fermentaţiei, care desemnează un tip de respiraţie anaerobă (lactică sau alcoolică). Astfel, microorganismele îşi procură energia necesară creşterii şi dezvoltării, în absenţa oxigenului, prin descompunerea glucidelor până la produşii finali caracteristici fiecărui tip de fermentaţie (acid lactic în cazul fermentaţiei lactice, respectiv etanol în cazul fermentaţiei alcoolice). Etimologic cuvântul fermentaţie provine din latinescul *fervere* care înseamnă a fierbe (Muntean 2013).

Multiplicarea microorganismelor într-un bioreactor este influenţată de o serie de factori de mediu, cei mai importanţi fiind: tipul mediului de cultură, concentraţia substratului, calitatea şi cantitatea inoculului, temperatura, pH-ul şi rH-ul mediului de biosinteză, concentraţia oxigenului dizolvat şi agitarea.

1. Mediile de cultură. În procesele biotehnologice, mediul de cultură constituie suportul nutritiv sterilizat care permite dezvoltarea şi studiul unui microorganism în afara nişei ecologice naturale. Compoziţia mediilor de cultură are o mare importanţă asupra reproductibilităţii şi eficienţei tehnologiei respective. O serie de criterii permit clasificarea mediilor de cultură.

După consistenţă:

- Medii lichide;
- Medii solide;
- Medii semisolide.

După compoziţie:

- Medii naturale, care conţin elemente nutritive de origine vegetală sau animală;
- Medii sintetice, ce conţin doar compuşi cu structură chimică cunoscută care pot fi dozaţi în concentraţii fixe şi permit repetabilitatea şarjelor.

După tipul respirator al microorganismelor cultivate:

- Medii pentru microorganisme aerobe;
- Medii pentru microorganisme anaerobe.

După scopul şi frecvenţa întrebuinţării:

- Medii de uz curent;
- Medii speciale utilizate în general în studiile de izolare a microorganismelor la nivel de laborator, ce pot fi la rândul lor: elective, selective, de îmbogăţire, de conservare, de identificare.

După faza de biosinteză la care este utilizat mediul de cultură:

- Mediu destinat pentru laborator;
- Mediu pentru faza pilot;
- Mediu de cultură industrial.

După destinaţia finală a culturii dezvoltate:

- Medii pentru cultura inocul;
- Medii pentru cultura de regim numite şi medii de fermentaţie sau medii de biosinteză.

În biotehnologie se utilizează în mod curent mediile naturale având la bază subproduse agroalimentare, cumr ar fi: şrot de floarea soarelui, de soia, melasă, făină de porumb, tărâţe de grâu, extract de drojdie, extract de porumb. Aceste medii conţin în general elemente nutritive necesare dezvoltării microorganismelor, la care se adaugă de obicei cantităţi mici de săruri minerale. Mediile naturale sunt în general mai ieftine dar prezintă dezavantajul variabilităţii compoziţiei, ceea ce nu permite o standardizare corespunzătoare şi în consecinţă nu permite reproducerea procesului de biosinteză cu un randament constant. Spre deosebire de mediile naturale, mediile sintetice sunt perfect reproductibile la scară industrială.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conţină:

- Sursa de carbon (în general glucide: glucoză, amidon, lactoză, zaharoză);
- Sursa de azot care poate fi organic (aminoacizi, proteine, uree), sau anorganic (amoniac, sulfat de amoniu);
- Sursa de fosfor (fosfat amoniacal, fosfat monopotasic, fosfat dipotasic);
- Oligoelemente: K (clorură de potasiu sau fosfat dipotasic), Mg (sulfat de magneziu) etc;
- Factori de creştere: aminoacizi, proteine, vitamine, coenzime etc.

2. **Concentraţia substratului.** Celula microbiană este extrem de sensibilă la variaţiile parametrilor procesului de biosinteză, în special la concentraţia substratului. Mărirea concentraţiei de substrat în mediul de cultură poate conduce la dezvoltarea celulelor, dar numai până la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încetinită de procese de inhibiţie care au loc la nivel celular. Acţiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- Modificarea potenţialului chimic al substratului, intermediarilor sau a produsului finit;
- Modificarea permeabilităţii peretelui celular şi reducerea transportului substanţelor nutritive;
- Modificarea activităţii enzimelor implicate in procesul metabolic;
- Disocierea agregatelor metabolice;
- Modificarea parametrilor funcţionali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliţi).

Mecanismele prin care se realizează inhibiţia sunt:

- Reacţia chimică cu una sau mai multe componente celulare;
- Adsorbţia sau complexarea unor enzime sau coenzime;
- Intervenţia în secvenţele reacţiilor biochimice;
- Intervenţia în disocierea complexelor enzimatice;
- Modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (pH, tărie ionică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare);
- Intervenţia în funcţiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene, concentraţiile mari de substrat inhibă dezvoltarea microorganismelor, într-un anumit grad ajungând chiar la inhibiţie totală. Concentraţia optimă a substratului pentru un sistem de biosinteză se stabileşte atât în momentul iniţial cât şi pe parcurs. De exemplu, pentru foarte multe bacterii concentraţia de 15% în sursă de C (glucoză, zaharoză) are efect inhibitor, ele dezvoltându-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Ecuaţia lui Monod stabileşte expresia de calcul a vitezei specifice pentru faza de creştere logaritmică a biomasei:

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S}\right)$$

Unde:

μ – viteza specifică de creştere a masei celulare când substratul este limitat
μ_{max} – viteza specifică de creştere a masei celulare când substratul nu este limitat
K_s – constanta de saturaţie (concentraţia substratului la care viteza de creştere specifică este jumătate din viteza maximă)
S – concentraţia substratului

Această relaţie s-a dovedit a fi adevărată în condiţiile în care procesul de creştere bacteriană este limitat la concentraţia unui singur substrat şi raportul S / K_s are valoare mică.

3. Dimensiunea inoculului. Calitatea şi cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obţinerea unor metaboliţi cu randamente dorite de biosinteză. Cel mai adesea se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina o declanşare rapidă a dezvoltării culturii, concomitent cu reducerea riscului de contaminare. În majoritatea cazurilor este necesar ca dimensiunea inoculului să se situeze între 3–10% din volumul total al culturii. Pentru fiecare tehnologie în parte se stabileşte raportul optim de inoculare, care defineşte dimensiunile optime ale inoculului. Pentru asigurarea unei productivităţi şi măsurarea densităţii inoculului se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluţie optim, pentru obţinerea unei producţii maxime a metabolitului dorit, şi se determină parametrii specifici (numărul de germeni per unitate de volum, sau conţinutul în biomasă uscată raportat la unitatea de volum).

Efectele determinate de mărimea şi vârsta inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme. De exemplu, la bacterii, mărimea inoculului are influenţă pronunţată asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor în funcţie de care variază capacitatea de biosinteză a metabolitului dorit. Când se utilizează o cantitate mare de inocul, se reduce faza de lag. Uneori însă, cantităţile mari de inocul determină apariţia unui fenomen de autoinhibiţie datorat sensibilităţii celulelor bacteriene faţă de unii produşi metabolici intermediari. Pe de altă parte, când mărimea inoculului este însă prea mică, faza de lag poate fi prelungită la infinit şi aceasta nu poate conduce la o dezvoltare normală a culturii de microorganisme, neatingându-se biosinteza metaboliţilor secundari de interes. S-a observat că, în cazul bacteriilor, pentru iniţierea dezvoltării unui inocul este necesară prezenţa în mediul de cultură a unor microelemente şi oligoelemente. Spre exemplu, pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară o concentraţie minimă de mangan, în vederea iniţierii dezvoltării.

În cazul drojdiilor, cantitatea de inocul poate influenţa de asemenea durata fazei de lag sau stadiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor. În cazul fungilor,

importanţa standardizării inoculului vegetativ este hotărâtoare: pentru obţinerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea poate să apară fenomenul de autoinhibiţie sau autostimulare a germinării sporilor datorită prezenţei unor substanţe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare. În cazul fungilor, cantitatea de inocul influenţează mărimea şi forma miceliului precum şi randamentul producerii de metaboliţi. Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de miceliu dezvoltat ulterior să nu fie prea mare în detrimentul secreţiei metabolitului dorit. O dezvoltare abundentă a biomasei conduce în acelaşi timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel ineficientă.

4. Temperatura. Temperatura este un factor care acţionează în mod direct asupra microorganismelor, diferenţa dintre temperatura mediului înconjurător şi cea intracelulară trebuie să fie nulă. Pentru un proces de biosinteză industrial, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanţi, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului. Variaţiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerinţelor nutritive ale microorganismului şi compoziţiei biomasei obţinute precum şi asupra vitezei de creştere microbiană. În funcţie de domeniul de temperatură în care microorganismele ating viteza maximă de creştere, acestea se clasifică în: criofile, mezofile şi termofile. Microorganismele industriale sunt în general mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25-35°C. Temperatura optimă a proceselor catalizate de enzime animale este de 40-50°C, iar a celor catalizate de enzime vegetale de 50-60°C. Efectul temperaturii asupra creşterii microorganismelor se explică prin faptul că aceasta afectează multe procese metabolice din celulă precum şi conţinutul biomasei în proteine şi lipide sau conţinutul în ARN al celulei. Este posibil ca structura lipidică a membranei celulare să se modifice continuu în funcţie de variaţiile de temperatură, astfel încât membrana să-şi menţină funcţia reglatoare.

Matematic, influenţa temperaturii asupra reacţiilor enzimatice este descrisă de ecuaţia lui Arrhenius:

$$k = Ae^{-\left(\frac{Ea}{RT}\right)}$$

Unde:

k – constanta de echilibru
A – factorul de frecvenţă
E_a – energia de activare
R – constanta gazelor (0,082056 atm/ mol × K)

5. pH-ul şi rH-ul. Valoarea pH-ului este, alături de temperatură, un parametru important în procesele de biosinteză. Influenţa valorii pH-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene se poate urmări în câteva direcţii:

- pH-ul optim pentru dezvoltare. În general microorganismele au un domeniu optim de pH pentru dezvoltare, în care viteza specifică de creştere atinge valoarea maximă. Spre exemplu, pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de pH se situează între valorile de pH 4 şi 5. Există însă şi specii de drojdii care cresc la valori de pH în jur de 2 sau, dimpotrivă, la valori ridicate ale pH-ului în jur de 8, cum sunt drojdiile din genul *Rhodotorula* folosite pentru biosinteza fenilalaninei. Cultivarea microorganismelor la valori scăzute ale pH-ului (pH 3-4) prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare, ceea ce este apreciat în mod deosebit în cazul unei cultivări industriale.

• Efectul valorii pH-ului asupra randamentului de conversie a substratului la un anumit produs. Formarea produsului dorit în urma procesului de biosinteză poate să fie legată de desfăşurarea bioprocesului într-un domeniu foarte strict de pH. În timpul dezvoltării unei culturi microbiene apar deviaţii ale pH-ului de la valoarea considerată optimă care pot avea urmări nedorite asupra procesului de biosinteză. Aceste modificări se pot datora fie metabolismului celular (consumarea sursei de carbon sau consumarea sursei de azot), fie producerii unui acid organic. Pentru corectarea pH-ului la valoarea prescrisă se adaugă acizi sau baze. Dacă valoarea pH-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corecţie, soluţii de hidroxid de sodiu sau hidroxid de potasiu, în funcţie de compoziţia chimică a mediului şi de necesarul în ioni de Na^+ şi K^+ al microorganismului; în acelaşi scop este mult răspândită utilizarea amoniacului gazos sau soluţie. Dacă valoarea pH-ului este peste cea recomandată se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic în funcţie de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creşterea), de compoziţia chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric ar putea conduce la formarea unor săruri greu solubile) precum şi de materialul de construcţie al vaselor de reacţie şi al bioreactoarelor (probleme de coroziune).

• Efectele de agregare, adsorbţie, coagulare şi floculare. Prin efectul de disociere a acizilor şi bazelor, pH-ul acţionează asupra caracteristicilor suprafeţei celulei, modificând proprietăţile ei de aderare la diferite materiale (biofilm) precum şi cele de floculare.

Pentru caracterizarea sistemelor reducătoare la nivel celular, se utilizează rH-ul, definit ca logaritmul cu semn schimbat al concentraţiei hidrogenului molecular. Valoarea momentană a rH-ului reprezintă rezultatul tuturor proceselor de oxido-reducere ce au loc între mediu şi celulă şi descrie dinamica metabolismului primar şi secundar. rH-ul oferă informaţii asupra limitei inferioare a oxigenului necesar proceselor metabolice. rH-ul se determină după relaţia lui Nernst, în funcţie de potenţialul redox al sistemului:

$$rH = \frac{E_h}{0{,}029} + 2pH$$

$$Eh = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{C_{ox}}{C_{red}}\right)$$

Unde:
0,029 = (ln10)RT/2F la 298 K
E_h – potenţialul redox al sistemului
E_0 – potenţialul normal al sistemului redox
n – numărul de electroni schimbaţi în procesul redox
F = constanta lui Faraday = $9{,}65 \times 10^4$ J/V × mol
C_{ox}, C_{red} – concentraţiile formelor oxidate şi reduse din sistem

6. Concentraţia de oxigen dizolvat. În culturile aerobe, este esenţial să se realizeze dizolvarea în mediul de cultură a întregii cantităţi de oxigen necesare celulei microbiene în orice moment al fermentaţiei, prevăzându-se în general un oarecare exces faţă de nevoi. Se urmăreşte obţinerea unor aerări cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă având loc cu viteze mari. Spre exemplu, dacă procesul de biosinteză se desfăşoară în laborator în flacoane agitate, aerarea depinde de următorii parametri: viteza de rotaţie sau translaţie a agitatorului,

mărimea flacoanelor, volumul mediului de cultură, turbulenţă. Eficienţa aerării unui mediu de cultură este reflectată de concentraţia oxigenului dizolvat.

Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantităţi de oxigen suficientă pentru a asigura o valoare maximă a activităţii metabolice în bioreactoare; în acest caz, un anumit microorganism şi un anumit mediu de cultură se caracterizează printr-o rată de utilizare a oxigenului specifică. Pentru conducerea bioprocesului este esenţială cunoaşterea exactă a modului de variaţie în timp a necesarului de oxigen şi a ratei consumului de oxigen. Rata consumului de oxigen sporeşte rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză. Valoarea maximă a ratei de consum a oxigenului coincide de obicei cu momentul atingerii unei concentraţii ridicate de celule microbiene. Necesarul de oxigen al culturii este influenţat de mediul de biosinteză utilizat, respectiv de sursa de carbon. De exemplu, la fungii din genul *Penicillium*, necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon faţă de zaharoză.

Alţi factori care influenţează transferul de oxigen:

- Agenţii tensioactivi determină o micşorare a coeficienţilor de transfer;
- Densitatea celulară: la concentraţii ridicate, vâscozitatea mediului creşte iar eficienţa sistemului de aerare scade, bulele tinzând să circule prin canale preferenţiale, cu rezistenţă redusă la înaintare;
- Sistemul de agitare al bioreactorului influenţează sensibil concentraţia oxigenului dizolvat: o agitare eficientă a mediului de cultură conduce la o dispersie corespunzătoare a bulelor de aer şi deci la mărirea coeficientului de transfer a oxigenului;
- Echipamentul de aerare permite obţinerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer;
- Suprapresiunea favorizează concentraţia oxigenului în mediul de cultură: în general procesele biotehnologice sunt conduse la suprapresiuni cuprinse între 0,5 – 1 atm, în scopul micşorării riscului de infecţie.

7. Agitarea. Rolul agitării este asociat cu transportul de oxigen şi substanţe nutritive către celule. Puterea necesară depinde de tipul microorganismului, fiind cuprinsă între 0,1 şi 1,4 kW/m^3. Ea variază în funcţie de dimensiunile fermentatorului şi agitatorului, de conţinutul de aer, constantele fizice ale biomasei etc. Criteriul care caracterizează intensitatea agitării este timpul de amestecare, adică timpul în care se realizează egalizarea concentraţiei în masa din fermentator. Acest timp ia în calcul parametri geometrici (rapoarte dimensionale) şi parametri tehnologici (compoziţia mediului, vâscozitatea, densitatea, aeraţia), fiind descris de o ecuaţie generală de forma:

$$\tau_\alpha = \varphi\left(\pi Ki, \quad \frac{d}{Dv}, \quad n, \quad \frac{Va}{V}, \quad \mu, \quad \rho\right)$$

Unde:

τ_α – timpul de amestecare

πKi – produsul rapoartelor geometrice

d/Dv – diametrul cercului descris de agitator raportat la diametrul fermentatorului

n – număr rotaţii per minut

Va/V – volumul de aer utilizat în reacţie, raportat la volumul de lichid

μ – vâscozitatea mediului

ρ – densitatea lichidului de cultură

4.3. Separarea produşilor obţinuţi prin biosinteză

Gradul înalt de puritate necesar bioproduşilor specifici industriei farmaceutice conduce la dirijarea majoră a investiţiilor în extracţia şi purificarea produşilor de biosinteză. Exceptând enzimele industriale, ce sunt proteine cu mase moleculare relativ mari, substanţele biologic active obţinute prin biotehnologia tradiţională (antibiotice, aminoacizi, alcooli şi acizi organici) au mase moleculare relativ mici, deci proprietăţi fizice şi chimice bine definite. Dezvoltarea medicamentelor a produs zeci de ani molecule mici, care variază în complexitate, dar de obicei cântăresc mai puțin de 900 Da. De exemplu, aspirina cântărește 180 Da iar chimioterapicul taxol (Paclitaxel) derivat din taxan are masa moleculară 854 Da. Biotehnologia modernă serveşte obţinerii unor substanţe complexe cu mase moleculare mari şi cu activitate terapeutică intensă. Agenţii biologici sunt molecule semnificativ mai mari și mai complexe, de la 3.000-150.000 Da, iar utilizarea lor terapeutică necesită forme injectabile. Insulina, de exemplu, cântărește 5.808 Da, în timp ce un anticorp monoclonal cum este adalimumab (Humira) cântărește 148.000 Da.

În cazul biofarmaceuticelor obţinute prin fermentaţie, produşii de interes se găsesc fie în mediul de cultură, fie în biomasa celulară, iar separarea lor se poate realiza prin procese relativ simple şi eficiente, care presupun următoarele etape:

1. Separarea solid - lichid
2. Izolarea primară a produsului
3. Purificarea

1. Separarea solidelor presupune procedee specifice precum filtrarea masei celulare, centrifugarea, coagularea şi flocularea, fracţionarea spumei. Dificultăţile sunt puse de mediile de cultură concentrate şi de natura masei celulare bacteriene sau a miceliilor micromicetelor, care pot fi fibroase, mucilaginoase, sau sub formă de pastă.

Filtrul rotativ cu vid este format dintr-un tambur rotativ compus din doi cilindri orizontali coaxiali. Cilindrul exterior este perforat şi acoperit cu material filtrant, iar spaţiul dintre cei doi cilindri este împărţit în celule etanşe, fiecare funcţionând succesiv şi independent. Îndepărtarea biomasei celulare de pe tambur se face cu ajutorul unei lame. Optimizarea filtrării se poate realiza prin perfecţionarea echipamentelor şi prin modificarea proprietăţilor de filtrare. Metodele de prelucrare a lichidelor greu filtrabile includ coagularea termică şi acidă a proteinelor semicoloidale, prelucrarea lichidelor cu electroliţi pentru favorizarea agregării miceliului, adăugarea de ingredienţi în lichidul de filtrare. Filtrabilitatea soluţiilor este influenţată şi de pH.

Microfiltrarea este utilizată în mod eficient pentru a îndepărta celulele întregi sau resturile celulare din soluție. Filtrele cu membrană utilizate în procesul de microfiltrare au în general diametre ale porilor variind de la 0,1 la 10 µm. Astfel de pori, în timp ce rețin celule întregi și particule mari, nu reușesc să rețină majoritatea componentelor macromoleculare, cum ar fi proteinele.

2. Izolarea primară a produsului presupune extracţia din lichidele filtrate fără distrugerea celulelor (când produsul este disponibil extracelular) sau cu disrupţia prealabilă a celulelor (când produsul de interes se acumulează intracelular). Procedeele utilizate sunt:

- Extracţia lichid-lichid cu ajutorul solvenţilor organici, ce se realizează cu ajutorul extractoarelor centrifugale;
- Extracţia pe schimbători de ioni, ce utilizează răşini schimbătoare de ioni precum cationiţi cu grupe carboxilice sau sulfonice sau anioniţi cu grupări aminice, dispuşi în aparate cilindrice, în coloane sau în conuri, cu sau fără site. Separarea necesită următoarele operaţii: activarea ionitului, reţinerea lui, eluarea şi regenerarea;
- Precipitarea cu reactivi specifici, urmată de extracţia cu solvenţi, ce se bazează pe adăugarea de săruri anorganice şi obţinerea unor săruri insolubile (penicilina ca sare de potasiu, eritromicina sub formă de lactat şi oxalat etc).

3. **Purificarea** se realizează prin cristalizare, pentru substanţele care nu sunt inactivate prin tratament termic, sau prin cromatografie ori adsorbţie (utilizând cărbune activ, oxizi de siliciu, aluminiu şi titaniu, diferite argile). Produsele biotehnologiilor netradiţionale sunt în general macromolecule intracelulare, deseori incluziuni citoplasmatice insolubile, cu proprietăţi fizice şi chimice similare cu cele ale contaminanţilor. Separarea şi purificarea acestora se realizează prin metode specifice care pot asigura puritatea şi omogenitatea ridicată necesară formelor terapeutice. Astfel sunt cromatografia de schimb ionic, cromatografia de permeaţie, cromatografia de afinitate şi imunoadsorbţie.

Ultrafiltrarea cu ajutorul cartuşelor ce conţin medii filtrante funcţionează pe baza excluderii în funcţie de dimensiune şi formă, precum și a interacțiunii în funcţie de sarcină. Diametrul porilor între 0,1 şi 20 nm permite reținerea fracţionată a proteinelor cu masă moleculară mică, de la 1 la 300 kDa. Filtrele sunt fabricate din esteri de celuloză (acetat sau nitrat de celuloză, utilizate mai ales la nivel de laborator), sau din nailon, poliester, polipropilenă, polietersulfonă, clorură de polivinil, policarbonat etc pentru filtrarea în proces. Astfel de membrane prezintă o stabilitate chimică și fizică îmbunătățită. Filtrele hidrofobe din politetrafluoretilenă (teflon) sunt de regulă utilizate pentru sistemele de aerare, dar şi a soluţiilor agresive.

Cromatografia este o tehnică de separare a amestecurilor în componentele sale, cu scopul de a analiza, identifica, purifica şi /sau cuantifica produşii de interes. Cromatografia se bazează pe interacţiunea diferenţiată a doi sau mai mulţi compuşi de separat (numiţi soluţi) cu ajutorul a două faze cromatografice: faza mobilă şi faza staţionară. Faza mobilă fluidă conţine substanţa (antibiotic, proteină etc) sau substanţele (amestecul de proteine sau proteină şi impurităţi) care trebuie separate.

Principalele avanteje pe care le prezintă cromatografia ca metodă de separare sunt:

- Permite separarea, identificarea şi dozarea cantitativă a componentelor unui amestec;
- Se poate aplica unui număr foarte mare de produse, practic orice biomoleculă poate fi separată printr-o metodă cromatografică;
- Sensibilitatea metodelor cromatografice este extrem de ridicată. În acelaşi timp însă se pot aplica şi la scară preparativă;
- Durata analizei este redusă, comparativ cu alte metode de analiză ale amestecurilor complexe.

Primul cromatograf de lichide modern a fost construit de inginerul chimist Csaba Horváth la Universitatea din Yale în 1964, tehnica fiind denumită cromatografie de lichide de înaltă presiune. Ulterior, s-a impus termenul de cromatografie de lichide de înaltă performanţă (HPLC). Prima separare realizată a fost cea a unor componente ale acizilor nucleici. Dezvoltarea extraordinară a acestei tehnici se datorează în mare măsură faptului că a permis analiza unor compuşi greu

separabili prin alte metode, cum este şi cazul biomoleculelor. În cazul compuşilor biofarmaceutici, principalele tipuri de cromatografie utilizate pentru purificare sunt:

Cromatografia de schimb ionic se bazează pe principiul atracţiei electrostatice reversibile a moleculelor încărcate pozitiv sau negativ (proteine, acizi nucleici etc) spre o matrice ce conţine ataşate covalent grupări de sarcină opusă. Etapa de legare este urmată de etape de spălare şi în final de eluare.

Cromatografia de afinitate este o tehnică de separare a proteinelor, acizilor nucleici, hormonilor, celulelor, pe baza proprietăţilor lor de legare specifică, prin forţe necovalente, de moleculele complementare numite liganzi. În cadrul acestei metode cromatografice faza staţionară este constituită de o matrice polimerică poroasă (dextran, agaroză, poliacrilamidă) de care se leagă covalent ligandul. Este un tip de cromatografie de schimb ionic şi se bazează pe afinitatea unor proteine pentru compuşi cu masa moleculară redusă. Numai macromoleculele care au afinitate pentru ligand sunt reţinute în timpul migrării lor pe coloană.

Un exemplu în acest sens îl constituie **cromatografia de imunoafinitate**, în care anticorpii imobilizați pot fi folosiți ca adsorbanți de afinitate pentru antigene. Anticorpii, ca multe alte biomolecule, pot fi imobilizați pe o matrice de suport adecvată printr-o varietate de proceduri de cuplare chimică. În procesul de purificare, afinitatea ridicată dintre anticorp şi ligand poate face deseori desorbția ulterioară a ligandului dificilă. Desorbția poate necesita condiții care duc la denaturarea parțială a proteinei legate: modificarea pH-ului tamponului ori a puterii ionice sau utilizarea unor agenți chimici perturbatori.

Cromatografia de permeaţie sau de filtrare prin gel se bazează pe diferenţa dintre dimensiunea şi forma proteinelor. Amestecul de proteine este aplicat în partea superioară a unei coloane conţinând particule poroase insolubile (Sephadex, Biogel P sau Biogel A). Doar moleculele mici pot fi adsorbite pe aceste particule denumite site moleculare, nu şi moleculele mari. În această manieră proteinele mai mari, care nu pot intra în porii sitei, trec mult mai rapid prin coloană şi sunt eluate primele. Proteinele rămase sunt eluate în ordinea descrescătoare a masei lor moleculare.

Purificarea avansată a proteinelor biosintetizate se poate realiza prin tehnica **cromatografiei prin interacţiuni hidrofobe**. Metoda se bazează pe diferenţa de hidrofobie de suprafaţă a proteinelor, realizându-se prin interacţiuni necovalente şi neelectrostatice între proteine şi faza staţionară, folosindu-se soluţii concentrate de săruri care reduc hidratarea proteinelor.

Alte procese de separare utilizate în biotehnologii farmaceutice:

- **Micelii reversibile,** metoda precipitării selective cu solubilizarea proteinelor în solvenţi apolari şi formarea unor mici picături apoase stabilizate cu ajutorul unor surfactanţi. Prin controlul pH-ului şi a tăriei ionice cu clorură de potasiu, o proteină dintr-un amestec va trece în faza apoasă, iar celelalte sunt solubilizate în micelii reversibile;
- **Extracţia de afinitate continuă** presupune succesiunea unor adsorbţii şi desorbţii reluate ciclic. Prin fixarea unei rate de desorbţie mici se asigură purificarea şi concentrarea produsului finit;
- **Integrarea operaţiilor de fermentaţie cu cele de separare** pentru eficientizarea proceselor biotehnologice: extracţia lichid-lichid, adsorbţia pe schimbători de ioni paralel cu fermentaţia etc.

4.4. Criterii de evaluare a proceselor biotehnologice

Alegerea tehnologiei de producţie şi a metodei optime se face după evaluarea tehnico-economică a proceselor biotehnologice. Pentru asimilarea industrială a proceselor biotehnologice convenţionale, acestea trebuie să îndeplinească obligatoriu următoarele cerinţe:

- Produsul de reacţie să fie obţinut cu participarea agentului biologic;
- Costul produsului obţinut să nu depăşească foarte mult costul materiei prime;
- Medicamentul obţinut prin biotehnologie să fie foarte eficient şi reţinut în organismul uman în cantităţi extrem de mici;
- Obţinerea produsului pe cale biotehnologică să fie cea mai rentabilă alternativă de preparare a produsului.

Criteriile de evaluare a eficienţei proceselor biotehnologice sunt:

1. Productivitatea procesului biotehnologic
2. Randamentul de obţinere a produsului
3. Concentraţia finală a produsului în mediul de cultură
4. Consumul energetic specific
5. Consumul neproductiv de substrat şi energie în procesul de biosinteză.

5. BIOTEHNOLOGIA OBŢINERII ANTIBIOTICELOR

Farmacoterapia antimicrobiană reprezintă aplicaţia clinică a agenţilor antimicrobieni şi implică administrarea de medicamente cu toxicitate selectivă împotriva agenților patogeni implicați în infecții, care nu acţionează asupra celulelor gazdei. Terapiile antimicrobiene pot fi clasificate ca antibacteriene, antimicotice, antihelminitice, antiprotozoare şi antivirale. Versatilitatea agenţilor patogeni în ceea ce priveşte patogenitatea şi rezistenţa necesită eforturi în aplicarea noilor cunoştinţe şi metodologii ştiinţifice rezultate din cercetarea şi dezvoltarea atât a vaccinurilor cât şi a medicamentelor antiinfecţioase. Astfel, pentru prevenirea bolilor infecţioase se utilizează vaccinuri, substanţe dezinfectante, medicamente antimicrobiene propriu-zise şi vitamine, iar în scopuri curative se administrează tratamentul medicamentos specific bolii infecţioase în cauză, care este simptomatic (antialgice, antiinflamatorii, antipiretice, antitusive), etiotrop (medicamente antimicrobiene) şi patogenetic (tonice, imunostimulatorii).

Antibioticele sunt medicamente cu acţiune antimicrobiană specifică şi selectivă, capabile să oprească multiplicarea unor microorganisme patogene implicate etiologic în variate boli şi sindroame infecţioase. Bacteriocinele şi substanţele antimicrobiene produse de către plante sau animale nu se încadrează în această definiţie. Bacteriocinele sunt toxine proteice produse de către bacterii, cu acţiune inhibitorie asupra altor bacterii, în general aparţinând unor tulpini similare sau înrudite filogenetic (ex. colicinele produse de *E. coli*). În concept biotehnologic, antibioticele sunt produşi rezultaţi din metabolismul microorganismelor. În prezent, căile de producere a antibioticelor sunt fermentaţia, sinteza chimică şi semisinteza.

Descoperirea şi utilizarea la scară largă a antibioticelor a adus beneficii semnificative umanităţii, contribuind la controlul bolilor infecţioase, principala cauză a morbidităţii şi mortalităţii de-a lungul timpurilor. Acest moment istoric a marcat scindarea cronologică a civilizaţiei umane în două epoci: era pre-antibiotică şi era antibiotică. Şi totuşi, contrar credinţei că expunerea la antibiotice este apanajul civilizaţiei moderne, urme de tetraciclină au fost identificate în schelete umane datând din anii 350-550 e.n., iar efectele benefice ale unor culturi de mucegaiuri asupra rănilor infectate se cunoşteau din timpuri străvechi şi exemplele pot continua (Aminov 2010).

Este însă bine-cunoscut momentul istoric care a marcat descoperirea penicilinei, printr-o „serie de evenimente întâmplătoare de aproape incredibilă improbabilitate” (Macfarlane, 1984). În anul 1928, bacteriologul scoţian Alexander Fleming a observat efectul inhibitor al fungilor din genul *Penicillium* asupra stafilococului auriu, afirmând că acest efect este mediat de un compus antibacterian pe care l-a denumit penicilină. Abia 10 ani mai târziu, chimistul de origine germană Ernst Chain, cercetător la Oxford, a purificat produsul şi a intuit structura chimică a penicilinei. Howard Florey, farmacolog şi patolog de origine australiană, a continuat prin studii clinice, la Oxford, cercetările lui Fleming. Se estimează că descoperirile lui Florey au salvat peste 82 de milioane de vieţi. Companiile farmaceutice englezeşti nu puteau produce medicamentul în timpul celui de Al Doilea Război Mondial, aşa încât o colaborare anglo-americană s-a dovedit benefică. Howard Florey împreună cu Norman Heatley au debarcat în America în anul 1941, unde micologul Charles Thom a identificat tulpina ca fiind *P. notatum.* Ulterior, în producţia industrială a fost

utilizată o tulpină de *P. chrysogenum* izolată dintr-un pepene verde. Microbiologul american Andrew J. Moyer a adus contribuţii însemnate în obţinerea industrială a penicilinei, optimizând fermentaţia şi reuşind să sporească randamentul de producţie al antibioticului de 10 ori. Astfel, dacă în anul 1940 penicilina era un lux nepreţuit, în anul 1943 o doză ajunsese să coste 20 $, iar în 1946 devenise larg accesibilă, la un preţ de 0,55 $ per doză. Acest preţ reprezintă în valoarea actuală circa 10 $, luând în calcul doar inflaţia, însă raportat la veniturile câştigate, echivalează cu circa 50 $. În paralel, cercetătorii francezi şi cei olandezi încercau progrese în obţinerea antibioticului, păstrând secretul în vremuri de război. Cercetătorii olandezi au reuşit să producă un antibiotic denumit Bacinol, cu ajutorul unei tulpini de *P. baculatum*. Pentru contribuţiile lor, Alexander Fleming, Howard Florey şi Ernst Chain au fost distinşi cu Premiul Nobel pentru Medicină în anul 1945 (Gaines 2017).

Termenul de antibiotic a fost introdus în anul 1941 de către microbiologul american Selman Waksman şi colaboratorii săi, pentru a descrie antagonismul pe care îl exercită o substanţă produsă de către un microorganism asupra multiplicării altor microorganisme. Dorothy Crowfoot Hodgkin, biochimist britanic, este cea care a descoperit structura moleculară a penicilinei, în anul 1945, deschizând astfel perspectivele dezvoltării antibioticelor. În anul 1964 cercetătoarea a fost distinsă cu Premiul Nobel pentru Chimie datorită descifrării structurii moleculare a peste 100 de substanţe, prin tehnica razelor X.

La ora actuală sunt cunoscute mii de substanţe cu acţiune antimicrobiană, şi în fiecare an se descoperă noi agenţi. Totuşi, o proporţie mică de antibiotice ajung să fie utilizate în terapia clinică, mare parte dintre compuşi fiind excluşi datorită toxicităţii ridicate. În prezent, antibioticele constituie cea de a cincea categorie de medicamente din topul vânzărilor, piaţa totală a antibioticelor fiind preconizată la peste 40 miliarde $ în 2025 (www.statista.com).

Cele mai frecvent utilizate antibiotice derivă din aproximativ 15 compuşi de bază, şi vizează 15 ţinte ale medicamentului în celula procariotă. Clasificarea antibioticelor se poate face după mai multe criterii.

După tipul microorganismului producător:
- Antibiotice produse de bacterii (gramicidină, bacitracină, polimixine);
- Antibiotice produse de actinomicete (streptomicină, tetraciclină, neomicină, kanamicină, nistatină, actinomicină);
- Antibiotice produse de fungi (peniciline, cefalosporine, griseofulvină).

Totuşi, clasificarea în funcţie de microorganismul producător nu este relevantă deoarece acelaşi microorganism poate produce mai multe antibiotice diferite ca structură şi proprietăţi farmacologice.

După structura chimică:
- Antibiotice cu structură alifatică (alicină);
- Antibiotice cu structură aromatică (cloramfenicol);
- Antibiotice cu structură chinonică (fumigatină);
- Antibiotice cu cicluri de piran şi furan (acid penicilanic);
- antibiotice heterociclice cu azot (acid aspergilic);
- antibiotice heterociclice cu azot şi sulf (peniciline);

- Antibiotice cu structură polipeptidică (gramicidină);
- Antibiotice cu structură complexă (macrolide);
- Antibiotice cu structură nedeterminată (viomicină).

După biogeneză:
- Antibiotice derivate din aminoacizi, unităţi asemănătoare (peniciline, bacitracină, daptomicină, cloramfenicol);
- Antibiotice derivate din acetat (griseofulvină, tetracicline, macrolide, poliene);
- Antibiotice derivate din glucide simple (streptomicină, kanamicină);
- Antibiotice complexe (novobiocină, vancomicină).

După acţiunea farmacologică:
- Antibiotice cu acţiune antibacteriană (peniciline, cefalosporine etc);
- Antibiotice cu acţiune tuberculostatică (streptomicină, rifampicină, cicloserină);
- Antibiotice cu acţiune antivirală (macrolide, tetracicline, pumilacidin);
- Antibiotice cu acţiune anticanceroasă (antracicline, mitozani, novobiocină);
- Antibiotice cu acţiune imunosupresivă (tacrolimus, sirolimus, pimecrolimus);
- Antibiotice cu acţiune antifungică (poliene, griseofulvină);
- Antibiotice cu acţiune antiprotozoarică (clindamicină, amfotericină B, artemisinină);
- Antibiotice cu acţiune antiparazitară (paromomicină, avermectină, artemisinină).

Nu toate antibioticele exercită aceeaşi acţiune antimicrobiană asupra germenilor patogeni, ci au un spectru caracteristic determinat de rezistenţa intrinsecă a microorganismului patogen. De regulă, antibioticele nu exercită efecte toxice asupra celulei eucariote. Excepţie face blasticidina S produsă de *Streptomyces griseochromogenes*. Pentru compuşii cu ţinte în afara celulei procariote se foloseşte termenul de agenţi antimicrobieni (antifungici, antivirali, antiparazitari etc), şi nu termenul de antibiotic.

După modul de acţiune:
- Asupra biosintezei peretelui celular (peniciline, cefalosporine, vancomicină, fosfomicină, cicloserină);
- Asupra biosintezei proteice (aminoglicozide, tetracicline, macrolide, lincosamide, streptogramine);
- Asupra replicării ADN (chinolone, rifampicină, novobiocină);
- Asupra membranei celulare (polimixine, daptomicină).

După similarităţile structurale şi mecanismul de acţiune (clasificarea general acceptată şi cel mai des folosită):
- Antibiotice beta-lactamice (peniciline, cefalosporine, carbapeneme);
- Aminoglicozide (streptomicină, gentamicină, neomicină);
- Chinolone (ciprofloxacină, levofloxacină, norfloxacină);
- Macrolide (eritromicină, azitromicină);
- Lincosamide (clindamicină);
- Sulfonamide (sulfazidin, trimetoprim-sulfametoxazol);
- Tetracicline (tetraciclină, tigeciclină);
- Glicopeptide (vancomicină).

Cercetarea şi dezvoltarea antibioticelor se desfăşoară după câteva principii general-valabile.

Stabilirea sensibilităţii unui germen faţă de un antibiotic implică determinarea:

- Concentraţiei minime inhibitorii (CMI) şi a concentraţiei minime bactericide (CMB);
- Timpului de înjumătăţire (T 50%), adică de reducere la jumătate a concentraţiei iniţiale de antibiotic. Este obligatorie în cazurile grave;
- Fenomenului de rezistenţă a unor microorganisme la un anume antibiotic;
- Efectului bartericid: omoară bacteriile sensibile;
- Efectului bacteriostatic: determină doar stoparea diviziunilor celulare.

Antibiograma reprezintă profilul de susceptibilitate la antibiotice al unei tulpini. În funcţie de rezultatele clinice, tulpinile bacteriene pot avea un profil:

A. Sensibil – efectul terapeutic este obţinut cu doze terapeutice uzuale;
B. Rezistent – efectul terapeutic nu poate fi obţinut cu doze terapeutice;
C. Intermediar rezistent (moderat sensibil) – succesul terapeutic este imprevizibil. Ar fi posibil cu doze mari sau la administarea locală a antibioticului.

Caracteristicile de **farmacocinetică şi farmacodinamie** a antibioticelor:

- Se administrează în general pe cale orală, dar şi topic, intramuscular sau intravenos;
- Majoritatea se absorb bine în diferite porţiuni ale tractului gastrointestinal şi apoi trec în circuitul sanguin, realizând în 0,5-2 ore concentraţii serice maxime;
- Spre deosebire de sulfonamide, difuziunea lor nu este oprită în cavităţile seroase, iar activitatea este micşorată de secreţiile purulente;
- Antibioticele majore se menţin în organism la concentraţii eficiente terapeutic un timp scurt, ceea ce impune repetarea administrării lor;
- Se poate evita acest neajuns prin obţinerea de derivaţi cu acţiune prelungită (ex. penicilina retard, claritromicina retard etc).

Producţia industrială a antibioticelor se bazează pe câteva principii tehnologice generale. Etapele parcurse în scopul obţinerii antibioticelor prin biosinteză:

1. Biosinteza se realizează în instalaţii speciale, în condiţii de sterilitate;
2. Tulpina producătoare selecţionată este cultivată pe mediu adecvat, în condiţii optime de pH, temperatură, aerare, agitare;
3. Antibioticul este sintetizat intracelular, apoi trece în mediul de cultură;
4. Se extrage compusul din mediul de cultură, prin metode complexe;
5. Se purifică antibioticul;
6. Se efectuează cercetări microbiologice şi farmacologice în urma cărora se stabileşte cu precizie spectrul de acţiune pe diferiţi germeni patogeni (exprimându-se în unităţi de activitate faţă de anumite tulpini standard), gradul de toxicitate *in vitro* şi pe animale;
7. Se studiază farmacocinetica: absorbţia, difuzia, metabolizarea şi excreţia;
8. Se stabileşte forma farmaceutică corespunzătoare proprietăţilor antibioticului şi scopului terapeutic urmărit (Butiuc-Keul 2014).

5.1. Chimioterapia şi antibioticele citotoxice

Termenul de chimioterapie a fost introdus la sfârşitul anilor 1800 de către cercetătorul geman Paul Ehrlich, pentru a desemna utilizarea substanţelor chimice în scop terapeutic. În termeni actuali, accepţiunea este echivalentă noţiunii de farmacoterapie. Chimioterapia antibiotică presupunea utilizarea unor substanţe chimice capabile să acţioneze selectiv asupra bacteriilor, fără specificitate asupra organismului gazdă. În anul 1909 Ehrlich a descoperit salvarsanul, denumirea comercială a arsfenaminei. Utilizat în tratarea sifilisului, salvarsanul poate fi considerat primul chimioterapic antimicrobian (antibiotic) descoperit (Gaines 2017). Până de curând, chimioterapicele desemnau compuşi sintetizaţi chimic, destinaţi tratării bolilor infecţioase şi tumorale, a căror tehnologie de producţie nu includea nicio etapă fermentativă, prin urmare nu se încadrau în conceptul biotehnologic de antibiotic. În prezent, chimioterapia defineşte tratamentul sistemic medicamentos al cancerului, implicând utilizarea unor substanţe care interferează metabolismul celular şi determină moartea celulei. Prin urmare, chimioterapicele sunt substanțe naturale, semisintetice sau sintetice, cu efecte inhibitoare selective contra celulelor atipice (neoplazice) cu efecte bine conturate din punct de vedere farmacodinamic.

Astfel, în categoria chimioterapicelor, alături de alte medicamente intră şi antibioticele chimioterapice, produse atât prin fermentaţie cât şi semisintetic. Antibioticele citotoxice includ molecule antineoplazice naturale precum:

- **Dactinomicina** (actinomicina D) (1954) produsă de *Streptomyces* sp.
- **Bleomicina** (1973) produsă de *Streptomyces verticillus*
- **Mitomicina** (1974) produsă de *Streptomyces caespitosus*
- **Daunorubicina** (1979) produsă de *Streptomyces peucetius*

Deşi au trecut mai bine de 80 de ani de la descoperirea lor, multe antibiotice citotoxice se regăsesc pe lista medicamentelor esenţiale a WHO. Aceste molecule naturale şi derivaţii lor au un potenţial extraordinar, care este studiat şi în prezent. Spre exemplu, **streptonigrina** produsă de *Streptomyces flocculus* este investigată pentru efectele sale antitumorale. Medicamentul ce conţine **plicamicina** produsă de *Streptomyces plicatus* a fost retras de pe piaţă, însă noi derivaţi cu structură şi proprietăţi îmbunătăţite sunt în dezvoltare.

Antraciclinele sunt molecule tetraciclice asemănătoare tetraciclinelor, având un schelet de antrachinonă conectat la un rest glucidic printr-o legătură glicozidică (**Figura 2**). Primele antracicline, descoperite în anii 1960, au fost **daunorubicina** şi **doxorubicina**, obţinute cu ajutorul bacteriei *Streptomyces peucetius*. Derivaţi ai acestor compuşi sunt epirubicina, idarubicina şi valrubicina. Alte medicamente utilizate clinic din grupul antraciclinelor sunt pirarubicina, aclarubicina şi mitoxantrona.

Daunorubicina este produsă de mai multe tulpini de tip sălbatic de *Streptomyces,* prin cultivarea pe medii de cultură (glucoză 4%, proteine 1,5%, NaCl 0,2%, KH_2PO_4 0,1%, $CaCO_3$ 0,1% şi adaosuri de sulfaţi de magneziu, zinc, cupru), printr-o tehnologie comună obţinerii antibioticelor. Separarea mixului de antracicline se realizează prin filtrare, iar purificarea prin reţinere pe schimbători de ioni, eluţie cu acid clorhidric, concentrare la vid şi atomizare.

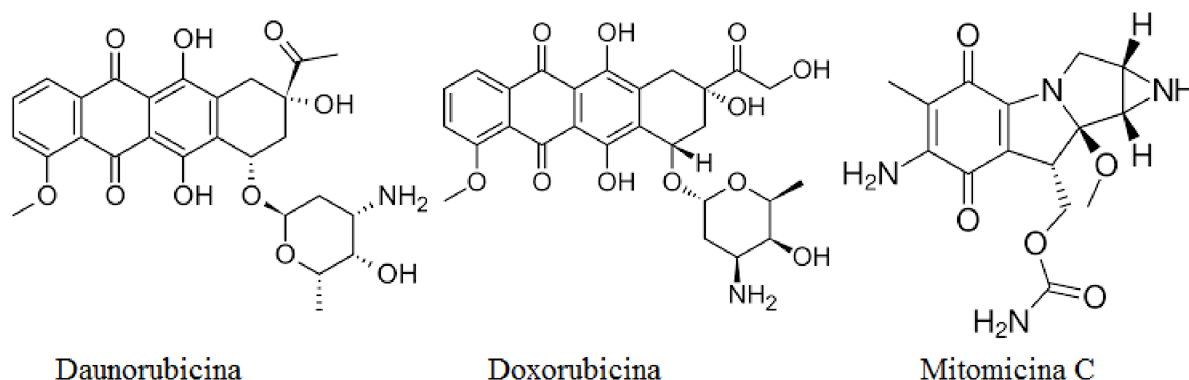


Figura 2. Structura unor antibiotice cu acţiune citostatică.

Doxorubicina are valoare terapeutică mai ridicată, însă este produsă natural de către streptomicete în cantităţi foarte mici. Deși doxorubicina poate fi produsă semisintetic din daunorubicină, procesul implică mai multe etape, printre care bromurare electrofilă, iar randamentul este slab. S-a avansat ideea că bacteriile ar putea completa mai eficient sinteza doxorubicinei de la daunorubicină, în procesul de fermentație. Astfel, aceasta este obţinută în prezent prin manipularea unor suşe de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* modificate genetic, pentru a facilita transformarea daunorubicinei în doxorubicină. Metodele de îmbunătățire a randamentului obţinerii doxorubicinei în procesul de fermentație utilizat în producția comercială includ introducerea prin intermediul plasmidelor a genei *DoxA*, ce codifică sistemul enzimatic de conversie a daunorubicinei în doxorubicină. Au fost astfel create tulpini superproducătoare, care supraexprimă produsul genei *DoxA*. De asemenea, au fost induse mutaţii pentru a dezactiva enzimele care catalizează transformarea precursorilor doxorubicinei în produşi mai puţin utili (Niraula şi colab. 2010).

Mecanismul de acţiune al antraciclinelor este nespecific ciclului celular, acestea având efecte citotoxice în orice etapă de dezvoltare a celulei, prin intercalarea între cele două catene ADN, inhibarea topoizomerazelor de tip II, generarea de radicali liberi de oxigen sau inducerea eliberării histonelor din cromatină.

Mitomicina C face parte din grupa **mitozanilor**, fiind izolată din *Streptomyces caespitosus* şi *Streptomyces lavendulae*. Fermentaţia se realizează în condiţii convenţionale. Mitomicina C este degradată rapid de o varietate de enzime, de aceea biomasa se tratează cu lauril sulfat de sodiu pentru inactivarea acestora. Separarea se realizează prin fitrare şi extracţie cu acetat de butil, filtratul se acidulează şi sarea se purifică.

Mitomicina C este un produs chimioterapic cu activitate antitumorală pronunţată, un agent alchilant ce inhibă sinteza ADN prin intercalarea între cele două catene ale helixului, iar la concentrații mari sinteza ARN și a proteinelor. Inhibă proliferarea limfocitelor B, T și a macrofagelor, afectează prezentarea antigenului, precum și secreția de interferon gamma, a factorului de necroză tumorală TNF-α și a interleukinei 2. Întrucât sunt disponibile puține antibiotice citostatice ce funcționează pe baza acestor mecanisme, mitomicina este o importantă substanţă terapeutică de origine microbiană. Eficienţa mitomicinei este explicată prin descoperirea recentă a unor căi adiţionale de citotoxicitate, precum afectarea ciclului redox prin inhibarea tioredoxin reductazei (Paz şi colab. 2012).

5.2. Antibioticele beta-lactamice

Antibioticele beta-lactamice includ peniciline, cefalosporine şi carbapeneme, precum şi unii compuşi mai nou intraţi în farmacoterapie: cefamicine, tienamicine, nocardicine, acid clavulanic etc. Sunt utilizate în practica terapeutică curentă:

- **Penicilinele**: benzilpenicilină (penicilină G), ampicilină, amoxicilină, amoxicilină – acid clavulanic, piperacilină, piperacilină – tazobactam, ticarcilină, ticarcilină –acid clavulanic, fenoximetilpenicilină, oxacilină, cloxacilină, dicloxacilină, flucloxacilină, mecilinam;
- **Cefalosporinele**: (I) cefalexină, cefazolină, cefadroxil; (II) cefaclor, cefuroximă; (III) cefiximă, cefotaximă, cefpodoximă, ceftazidimă, ceftriaxonă; (IV) cefepimă, cefpiromă (V) ceftobiprol, ceftarolină;
- **Carbapenemele**: doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem.

Au denumirea de la structura caracteristică, care include un inel β-lactam (**Figura 3**). Inelul β-lactam este o structură formată din patru atomi şi se întâlneşte foarte rar în natură, în afara grupului de antibiotice (Muntean 2013). Inelul β-lactam este condensat cu un pentaciclu la peniciline şi carbapeneme, respectiv cu un hexaciclu la cefalosporine.

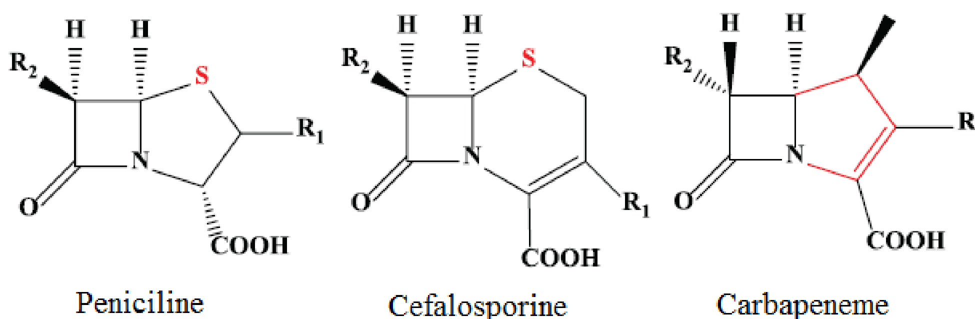


Figura 3. Similarităţi structurale ale antibioticelor beta-lactamice.

Din punct de vedere al structurii, antibioticele beta-lactamice convenţionale conţin inelul β-lactam, fie condensat cu un alt inel (tiazolidinic, dihidrotiazinic, carbapenem) sau necondensat cu alt ciclu (monobactam). Antibioticele beta-lactamice neconvenţionale conţin inelul β-lactam care are însă un atom de oxigen în loc de sulf, şi inelul oxazolidinic (Liras şi Martin 2006).

Antibiotice beta-lactamice convenţionale:

- **Peniciline** – penicilina G produsă de *Penicillium chrysogenum*
- **Cefalosporine** – cefalosporina C produsă de *Acremonium chrysogenum*
- **Cefamicine** – cefamicina C produsă de *Streptomyces clavuligerus*
- **Cefabacine** – cefabacina F1 produsă de *Lysobacter lactamgenus*

Antibiotice beta-lactamice neconvenţionale:

- **Clavami** – acidul clavulanic produs de *Streptomyces clavuligerus*
- **Carbapeneme** – tienamicina produsă de *Streptomyces cattleya*
- **Nocardicine** – nocardicina A produsă de *Nocardia uniformis*
- **Monobactami** – sulfazecina produsă de *Pseudomonas acidophila*

Modul de acţiune. Toate antibioticele beta-lactamice acţionează prin interferenţa cu sinteza peretelui celular bacterian, inhibând enzimele necesare biosintezei peptidoglicanului. Cu toate că au efect redus în cazul bacteriilor ce nu se divid, sunt letale pentru cele care se divid şi nu îşi mai pot sintetiza peretele celular care să le protejeze de şocul osmotic. Întrucât peptidoglicanul este prezent doar la bacterii, antibioticele beta-lactamice sunt foarte puţin toxice pentru organismele superioare.

5.2.1. Penicilinele

Au denumirea de la structura caracteristică, acidul 6-aminopenicilanic (6-APA), ce constă dintr-un inel tiazolidinic şi un inel β-lactam. La 6-APA, în poziţia 6, este ataşata o catenă variabilă. Lanţuri laterale cu aceeaşi formulă chimică pot intra în structura unor antibiotice din clase diferite şi pot fi responsabile de apariţia unor efecte secundare, de exemplu alergii. Există numeroase peniciline naturale (G, K, O, X, F, V), care diferă prin natura radicalului de care se leagă inelul β-lactam. Acest radical conferă denumirea antibioticului: benzilpenicilina (penicilina G), fenoximetil-penicilina (penicilina V) etc. Dintre cele uzuale în terapia bolilor infecţioase, numai **benzilpenicilina, penicilina V** şi **acidul clavulanic** sunt molecule naturale. Celelalte peniciline, toate cefalosporinele şi cefamicinele sunt derivate ale moleculelor obţinute prin biosinteză.

Pentru biosinteză trebuie îndeplinite câteva condiţii premergătoare, iar obţinerea unui anumit tip de penicilină depinde de:

- Natura microorganismului
- Condiţiile de cultură
- Prezenţa în mediul de cultură a unor precursori.

Condiţia primordială este de a avea o tulpină valoroasă a microorganismului producător. Penicilinele sunt produse în principal de micromicete din genul *Penicillium* cum este *Penicillium chrysogenum* (fostă *Penicillium notatum*), dar şi de specii aparţinând altor genuri: *Aspergillus, Acremonium* (fosta *Cephalosporium), Malbranchea, Emericellopsis, Paecilomyces, Anixiopsis, Trichophyton, Epidermophyton, Scopulariopsis*. Actinobacteriile din genul *Streptomyces* produc doar penicilina N, iar *S. clavuligerus* este exploatată în scopul biosintezei acidului clavulanic. O selecţie de tulpini valoroase se poate realiza prin mutageneză: iradiere cu raze UV, raze X, tratament cu clormetină (chimioterapic citotoxic de tip azotiperită). Tulpinile superproducătoare folosite în prezent au tendinţa de a-şi diminua capacitatea de producţie a antibioticului, în special în urma cultivării repetate pe medii agarizate. De aceea sunt păstrate în azot lichid la -196°C, sau sub formă de spori liofilizaţi.

Prepararea inoculului micelian pleacă de la spori liofilizaţi, prin treceri succesive pe medii de cultură tot mai voluminoase, până se ajunge la 5 – 10% din volumul tancului de fermentaţie.

Tulpina de micromicet se cultivă, în condiţii aseptice, în mediul de cultură conţinând drept sursă de carbon glucoza, melasa de sfeclă sau lactoza. Ca şi sursă de azot se adaugă must de cereale, cum ar fi extract apos de porumb (*corn steep*), un produs secundar la fabricarea amidonului din porumb (în acest fel biosinteza este ieftină şi se prelucrează un deşeu). Extractul de porumb conţine β-feniletilamină, ce funcţionează ca un precursor, favorizând formarea penicilinei G. Alţi precursori ai lanţurilor laterale sunt: acidul fenilacetic sau fenilacetamida, care trebuie menţinuţi la un nivel constant şi destul de scăzut, pentru a nu inhiba dezvoltarea mucegaiului. Există însă şi tulpini de

Penicillium neafectate de concentraţia fenilacetatului. Spre sfârşitul perioadei de fermentaţie sursa de azot se epuizează, aşa încât trebuie suplimentată. De regulă, sursa de carbohidraţi se adaugă intermitent, cu excepţia lactozei. Datorită represiei de catabolit, lactoza este utilizată numai după epuizarea din mediu a glucozei. Excesul de glucoză limitează producţia de penicilină prin inhibarea metabolismului secundar.

Mediul de cultură se menţine la un pH de 6,3, favorabil fermentaţiei. La începutul procesului, pH-ul este 7, apoi scade la 3, astfel că mediul se tamponează permanent cu NaOH pentru menţinerea unui pH optim.

Temperatura de fermentaţie se menţine la valori aproximative de 25°C. Productivitatea este mai mare dacă temperatura se reglează după faza de creştere: 30-32°C pentru trofofază şi 24°C pentru idiofază.

Aerarea şi agitarea trebuie să fie puternice, pentru a menţine componentele mediului în suspensie şi pentru a asigura concentraţia oxigenului dizolvat necesar mucegaiului, foarte aerob.

Fermentaţia pentru producerea penicilinei evoluează în trei faze:
1. Trofofaza: creştere rapidă a miceliilor, durează circa 30 de ore;
2. Idiofaza: creştere redusă a miceliilor, producţia antibioticului, durează 5-7 zile. Penicilina formată difuzează din miceliu în mediul de cultură, în miceliu ramâne doar 1%;
3. Faza de declin: epuizarea surselor de carbon şi azot, încetarea producţiei de antibiotic, liza miceliilor, creşterea pH-ului datorită eliberării amoniacului.

Calea biosintetică propriu-zisă a penicilinei. Ca multe alte antibiotice naturale, penicilina este derivată din molecule asamblate în sistem modular (Clardy şi colab. 2009). Fazele sintezei au fost identificate prin utilizarea izotopilor radioactivi (C^{14}, H^3 şi N^{15}). Primele două trepte ale biosintezei penicilinei şi cefalosporinei sunt comune. Penicilinele şi cefalosporinele naturale sunt formate din aceiaşi aminoacizi: acidul L-α-aminoadipic, L-cisteina şi L-valina. Condensarea, ciclizarea şi modificarea moleculei se derulează într-o succesiune de etape ale biosintezei (**Figura 4**):

I. În prima reacţie, cei 3 aminoacizi precursori sunt condensaţi pe cale non-ribosomală în tripeptida ACV (L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina sau tripeptida δ). Toate reacţiile necesare formării tripeptidei ACV sunt catalizate de o singură enzimă multifuncţională, denumită ACV-sintetaza.

II. În treapta a II-a, închiderea inelului oxidativ al tripeptidei liniare duce la formarea unei structuri inelare biciclice – acidul aminopenicilanic (APA), adică inelul β-lactam cu 4 atomi, fuzionat cu inelul tiazolidinic format din 5 atomi. Nucleul biciclic este comun pentru toate penicilinele. Reacţia este catalizată de izopenicilin-N-sintetaza. Rezultă izopenicilina N, cu activitate antibiotică slabă.

III. În treapta a III-a a biosintezei, lanţul lateral al acidului L-α-aminoadipic al izopenicilinei N este schimbat cu un grup acil hidrofob. Reacţia de transamidare este catalizată de enzima izopenicilin-N-N-aciltransferază.

Treptele I şi II, respectiv condensarea ACV şi formarea izopenicilinei N au loc în citosol, iar etapa III ce constă în legarea lanţurilor laterale se desfăşoară în peroxisomi (Meijer şi colab. 2010).

Reglarea biosintezei. Cele trei gene care codifică ACV-sintetaza, izopenicilin-N-sintetaza (ciclaza) și izopenicilin-N-aciltransferaza (*pcbAB*, *pcbC* și *penDE*) se află în acelaşi cluster la toţi fungii producători de penicilină (**Figura 4**). Transcrierea acestor gene la *P. chrysogenum* este puternic represată de glucoză, iar represia nu este inversată de pH-ul alcalin (Martin şi colab. 1999).

În cazul fungilor filamentoşi cum este *P. chrysogenum*, peroxisomii sunt organite esenţiale pentru obţinerea metaboliţilor secundari, de exemplu a penicilinei. Însă simpla proliferare a peroxisomilor, interferând fiziologia normală a celulei, poate dăuna producției de antibiotice (Meijer şi colab. 2010). Recent s-a descoperit că formarea peroxisomilor este controlată de proteine specifice numite peroxine, codificate de gene *PEX*. În genomul fungilor au fost identificate peste 30 de gene codificatoare ale peroxinelor, dintre care majoritatea sunt implicate în importul de proteine ale matricii și în formarea membranei organitelor. Supraexprimarea genelor *PEX11* şi *PEX14/17* intensifică rata de producție a penicilinei, prin creşterea volumului peroxisomilor şi manipularea proprietăților membranei peroxisomale prin activitatea proteinelor respective (Bartoszewska şi colab. 2011).

În celulele de *P. chrysogenum*, biosinteza tripeptidei ACV este catalizată de peptid-sintetaze non-ribosomale (NRPS) codificate de gena *pcbAB*, activată la rândul ei de gena *npgA*. Optimizarea productivităţii a fost mărită de 50 de ori prin utilizarea unei tulpini modificate de *Saccharomyces cerevisiae*, în genomul căreia au fost inserate cele două gene, împreună cu promotorii GAL1/GAL10. Noile instrumente de biologie sintetică combinate cu secvențierea nanopore au permis astfel biosinteza complexă, deschizând posibilitatea utilizării drojdiei pentru a accelera biosinteza rațională a antibioticelor peptidice non-ribosomale (Awan şi colab. 2017).

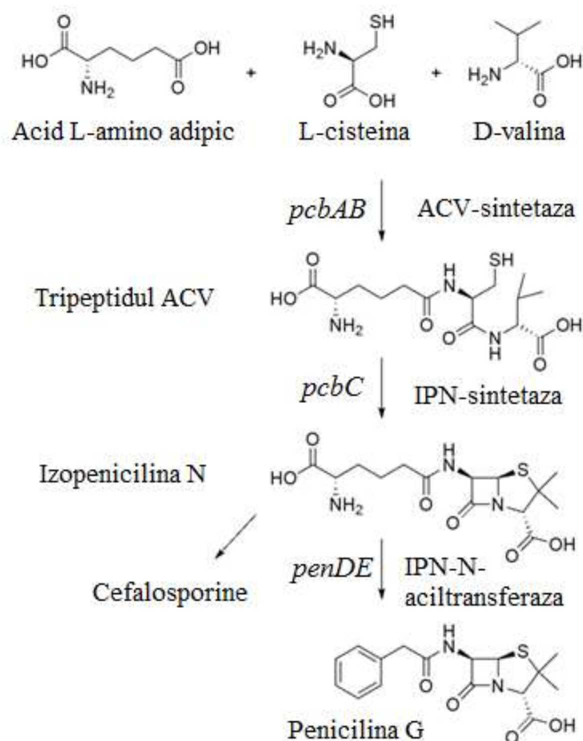


Figura 4. Reprezentare schematică a biosintezei penicilinei G la *Penicillium chrysogenum.*

Sinteza penicilinei este supusă mecanismului reglării prin feedback al sintezei metaboliţilor primari. Deşi penicilina este un metabolit secundar, obţinerea sa este influenţată de metaboliţii primari, precursorii biosintezei. Astfel, biosinteza L-valinei, un aminoacid esenţial, este reglată

printr-un mecanism de feedback negativ: valina exercită o acţiune inhibitorie a activităţii primei enzime a lanţului de biosinteză, acetohidroxid sintetaza (AHAS I). Dacă AHAS I este inactivată, biosinteza valinei este inhibată şi astfel este inhibată biosinteza tripeptidei ACV şi implicit a penicilinei. Un inhibitor ce scade rata de biosinteză a penicilinei este lizina. La fungi, L-lizina se sintetizează pe calea acidului L-α-aminoadipic, iar lizina exercită o inhibiţie feedback a activităţii primei enzime a lanţului de biosinteză (homocitrat sintetaza).

Extracţia penicilinei G. Pe lângă antibioticul de interes, mediul conţine numeroşi alţi produşi, iar extracţia se bazează pe solubilitatea, proprietăţile adsorbante şi ionice ale penicilinei, într-o succesiune de etape:

A. Mediul este transferat în tancuri pentru sedimentare şi clarificare, iar fermentaţia este oprită prin răcirea miceliului la 5-10°C, în paralel cu scăderea pH-ului la 6 şi adăugarea de formol 1-2% pentru a reduce contaminarea. Aceste măsuri sunt necesare deoarece penicilina este termolabilă şi foarte reactivă, fiind uşor distrusă la pH alcalin sau de către enzime;

B. După deproteinizare prin adăugare de $CaCl_2$, mediul se filtrează sau se centrifughează. Miceliul separat se spală, iar lichidele de spălare se reunesc cu filtratul iniţial;

C. Filtratul se prelucrează pentru obţinerea penicilinei: pH-ul se scade la 2 cu ajutorul acizilor minerali (acid fosforic) pentru o perioadă scurtă, iar extracţia se realizează cu un volum mic de solvent organic (amilacetat sau butilacetat);

D. Faza apoasă este separată de cea organică ce conţine penicilina prin centrifugare. Solventul este trecut printr-un strat de cărbune activ pentru îndepărtarea impurităţilor;

E. Se re-extrage penicilina cu un tampon fosfat 2%, la pH 7,5. Soluţia tampon conţinând penicilina se acidifică iar penicilina este din nou extrasă într-un volum mic de solvent organic, ajungându-se la concentrarea penicilinei de 80-100 de ori;

F. Penicilinele sunt acizi carboxilici şi trebuie convertite în săruri stabile în vederea conservării. Penicilina G concentrată este convertită în penicilinat de Na sau K, respectiv procain penicilină.

Penicilina V. Este rezistentă faţă de lichidele acide ale tractului digestiv şi se poate formula pentru administrare orală. Se obţine prin aceleşi metode descrise mai sus pentru penicilina G, cu mici diferenţe:

- Mediul de cultură conţine ca precursor acid fenoxiacetic;
- Separarea miceliilor este accelerată, deoarece în mediul bazic viteza de inactivare a penicilinei V este de 2,2 ori mai mare decât în cazul penicilinei G;
- Extracţia se realizează în două faze, penicilina V fiind puţin solubilă în apă. Astfel, după reextracţie şi acidulare penicilina V precipită.

Activitatea penicilinelor se exprimă în unităţi internaţionale (U.I.) şi este influenţată de structura moleculei, respectiv a radicalului (**Tabel 2**). O unitate de penicilină G sodică corespunde activităţii a 0,5988 μg din standardul internaţional, ceea ce înseamnă că 1 mg din această penicilină conţine 1,670 U.I. Activitatea antimicrobiană se instalează relativ rapid, cu mare intensitate, după 30-60 de minute. Penicilina este un antibiotic cu toxicitate redusă, organismul poate suporta administrarea unei cantităţi foarte mari, până la 50 milioane U.I./zi. În unele cazuri pot apărea tulburări fie din cauza intoleranţei locale, de obicei trecătoare, fie din cauza fenomenelor alergice (din cauza impurităţilor proteice), însă aceste inconveniente se pot evita. Penicilinele sunt incompatibile cu alcooli, oxidanţi, soluţii acide sau bazice, diferite metale (Butiuc-Keul 2014).

Tabel 2. Structura şi activitatea penicilinelor.

Denumirea penicilinei	Structura radicalului	Denumirea radicalului	Activitatea [U.I./mg]
Penicilina F	CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-	2-pentenil	1500
Dihidropenicilina F	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	2-pentil	1670
Penicilina G	C_6H_5-CH_2-	Benzil	1667
Penicilina X	HO-C_6H_4-CH_2-	*p*-hidroxi-benzil	900
Penicilina K	CH_3-$(CH_2)_5$-CH_2-	*n*-heptil	2300
Penicilina V	C_6H_5-O-CH_2-	Fenoximetil	1630
Penicilina O	CH_2=CH-CH_2-S-CH_2-	Alilmercoptometil	-
Penicilina S	CH_3-CCl=CH-CH_2-S-CH_2-	3-clor-2-buteniltiometil	-

Benzilpenicilina sub formă de sare de Na sau K se administrează intramuscular, deoarece aceste săruri dau un nivel mare al antibioticului în sânge. Dat fiind că penicilina se elimină rapid şi masiv prin rinichi, pentru a se menţine concentraţia biodisponibilă în jur de 0,03 U.I./ml este necesară administrarea în mod ritmic. Penicilinele cu acţiune prelungită precum procainpenicilina sau benzatin benzilpenicilina G (Moldamin) cedează molecule complexe care depăşesc acest inconvenient. Procain penicilina oferă o biodisponibilitate diferită, prin concentraţie plasmatică mai scăzută şi timp de retenţie mai îndelungat, ceea ce o face adecvată formulării pentru administrare sistemică. Procaina (novocaina) este un aminoester cu rol anestezic ce acţionează blocând canalele de sodiu şi prelungeşte activitatea penicilinei. Sunt disponibile comercial şi produse farmaceutice care combină ambele tipuri de molecule, penicilina cu acţiune rapidă şi penicilina depozit.

Spectrul de acţiune al penicilinelor

- Sunt active asupra bacteriilor Gram-pozitive: streptococi, penumococi, stafilococi, gonococi, meningococci;
- Mai sunt sensibili: *Bacillus anthracis*, *Clostridium* sp., *Corynebacterium diphteriae, Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Neisseria* sp. şi spirochete precum *Treponema pallidum*, *Leptospira;*
- Bacterii Gram-negative: *Pasteurella* sp. și unele tulpini de *Haemophilus influenzae;*
- Sunt active faţă de protozoare;
- Unii enterococi sunt rezistenţi;
- Bacteriile Gram-negative relevante clinic sunt în general rezistente: *Enterobacteriaceae (Escherichia coli,* specii de *Salmonella, Shigella, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Citrobacter), Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. etc.

5.2.2. Obţinerea penicilinelor semisintetice

Deoarece majoritatea penicilinelor de biosinteză sunt uşor inactivate de penicilinază, au labilitate termică mare şi nu acţionează asupra bacteriilor Gram-negative, s-a pus problema obţinerii unor derivaţi ce nu prezintă aceste dezavantaje. Penicilinele ideale ar trebui să prezinte:

- spectru antibacterian larg;
- stabilitate în mediu acid;
- stabilitate la penicilinază;
- toxicitate redusă.

Dacă procesul de biosinteză se desfăşoară fără modificarea catenei laterale, sunt produse penicilinele naturale. Obţinerea antibioticelor de semisinteză se bazează principiul utilizării moleculei native, de la care se obţin forme derivate, prin metode de sinteză chimică. Moleculele rezultate sunt asemănătoare celor naturale, dar modificarea moleculară atrage şi modificarea valorii terapeutice. De aceea, fiecare compus potenţial intră în screening şi ulterior în cercetare, dacă este cazul. Cele mai importante peniciline de semisinteză sunt ampicilina, amoxacilina, oxacilina şi meticilina. Prin sinteză chimică se poate realiza transformarea penicilinei în cefalosporină, prin extensia ciclului. Cele mai importante modificări chimice ale moleculei native sunt:

- Dezacilarea penicilinelor naturale în scopul obţinerii acidului 6-aminopenicilanic (6-APA);
- Acilarea grupării 6'-NH_2 din 6-APA şi obţinerea penicilinelor semisintetice;
- Esterificarea grupei 3-carboxil a penicilinei.

Majoritatea penicilinelor de semisinteză sunt produse pornind de la 6-APA, care se obţine prin dezacilarea benzilpenicilinei. 6-APA este excretat în mici concentraţii de către *Penicillium chrysogenum*, când microorganismul este cultivat în mediu fără acid fenilacetic. Prin urmare, 6-APA se produce prin hidroliza penicilinei G sau a penicilinei V, cu ajutorul penicilin-acilazei. Această enzimă hidrolizează legătura amidică a lanţului lateral (**Figura 5**).

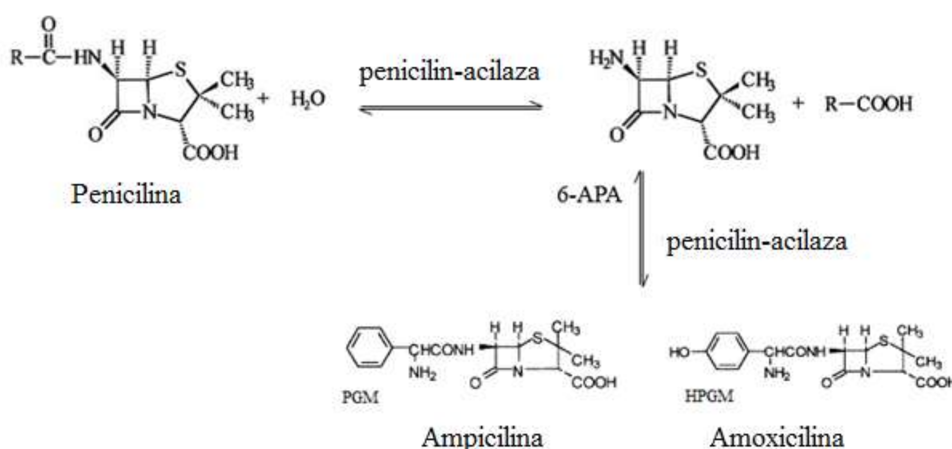


Figura 5. Schema obţinerii penicilinelor semisintetice prin intermediul acidului 6-aminopenicilanic (6-APA). Extensia ciclului se realizează cu ajutorul fenil-glicin-metil esterului (PGM) pentru obţinerea ampicilinei, respectiv a hidroxifenil-glicin-metil esterului (HPGM) pentru obţinerea amoxicilinei.

Activitatea penicilin-acilazei a fost evidenţiată la o varietate de bacterii, actinomicete, micromicete şi drojdii. Industrial sunt utilizate tulpini producătoare de *E. coli* şi *Bacillus megaterium*, iar enzima este imobilizată. Producția de 6-APA constituie una dintre primele aplicații comerciale de succes ale enzimelor imobilizate (Abian şi colab. 2008; Buchholz 2016). Deoarece costul 6-APA are un impact direct asupra costului penicilinei semisintetice, se urmăreşte îmbunătăţirea tehnologiilor de producţie a 6-APA, prin:

- Echilibrarea reacţiei şi limitarea acumulării produşilor finali;
- Limitarea inhibiţiei exercitate de către produşii secundari (acidul fenilacetic);
- Formarea de săruri cu ajustarea pH-ului;
- Îmbunătăţirea tehnicilor de separare şi purificare, dificilă datorită similarităţii produşilor de bioconversie.

Reducerea numărului de operaţii tehnologice, scăderea cantitativă a deşeurilor şi îmbunătăţirea randamenului de obţinere a 6-APA se pot îndeplini prin realizarea fermentaţiei în bioreactoare eficiente, continue, automatizate şi prin îmbunătăţirea performanţelor extracţiei

utilizând tehnici de separare cu ajutorul butilacetatului la pH scăzut, precum şi a utilizării filtrelor de cărbune activ în purificare. Ampicilina și amoxicilina sunt molecule cu caracter amfoter, având o grupare amino- liberă şi o grupare carboxil. Aceste îmbunătăţiri conduc la o eficienţă a procesului de 90% şi un cost aproximativ de 20 $/kg de penicilină, comparativ cu metoda convenţională al cărei eficienţe este de 70%, iar costul penicilinei de aproximativ 350 $/kg de penicilină (Kundu şi colab. 2019).

5.2.3. Cefalosporinele

Sunt antibiotice care fac parte din familia antibioticelor beta-lactamice, reunind mai mulţi compuși sub denumirea de cefalosporine sau cefeme. Structura chimică este asemănătoare cu cea a peniclinelor. Nucleul de bază este acidul 7-aminocefalosporanic (7-ACA), ce constă dintr-un inel β-lactam condensat cu un inel dihidrotiazinic (**Figura 6**).

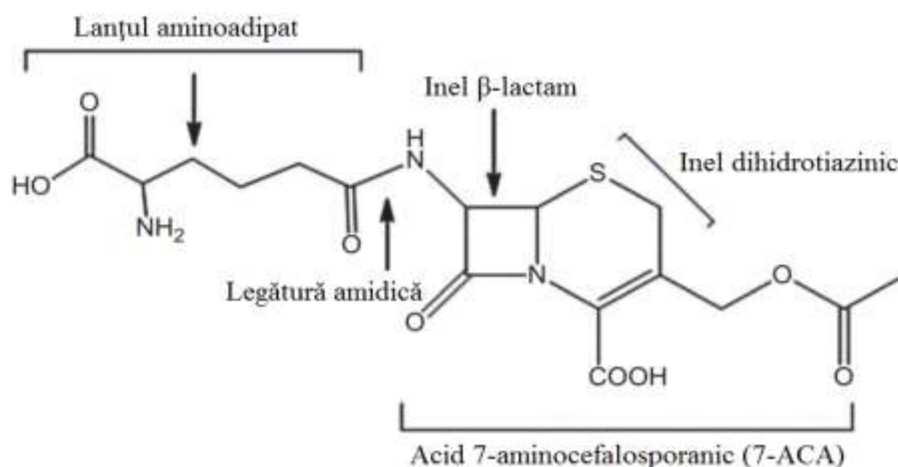


Figura 6. Structura cefalosporinei C.

Cefalosporine derivate:

- **Cefamicinele** - compuși naturali sau de semisinteză care au în plus o grupare metoxi- în poziția 7. Exemple: cefoxitină, cefotetan, cefmetazol;
- **Oxacefalosporinele** - compuși de semisinteză care au un atom de oxigen în locul S din poziția 1;
- **Carbacefemele** - au o grupare metilen în poziția 7.

Prima cefalosporină a fost descoperită în anul 1948 de către medicul italian Giuseppe Brotzu, izolată din culturi de *Cephalosporium acremonium* (redenumită *Acremonium chrysogenum*). El a observat efectul bactericid asupra agentului febrei tifoide, *Salmonella typhi*, enterobacterie producătoare de beta-lactamază. Ulterior s-a descoperit că *A. chrysogenum* produce cinci antibiotice cu moleculă hidrofobă, ce acţionează asupra germenilor Gram-pozitivi. S-a descoperit şi un produs hidrofil, activ şi asupra bacteriilor Gram-negative, denumit cefalosporina N. Acesta este de fapt penicilina N. În timpul purificării acesteia a fost izolată şi cefalosporina C, activă mai ales asupra bacteriilor Gram-negative, stabilă în mediu acid şi rezistentă la acţiunea penicilinazelor (Garcia-Estrada şi Martin 2011).

După criteriul clinico-biologic şi calea de administrare, cefalosporinele se clasifică în:

1. Cefalosporine de generaţia I:

- administrare orală: **cefalexină, cefradină, cefadroxil**;
- administrare parenterală: **cefazolină, cefalotină, cefapirină, cefadroxil**.

2. Cefalosporine de generaţia a-II-a:

- administrare orală: **cefaclor, cefuroximă, cefpodoximă, cefiximă**;
- administrare parenterală: **cefamandol, cefuroximă, cefmetazol, cefonicid, ceforanid, cefoxitină.**

3. Cefalosporine de generaţia a-III-a:

- administrare parenterală: **cefotaximă, ceftriaxonă, cefoperazonă, cefotetan, moxalactam, ceftazidimă, ceftizoxim, ceftibuten, proxetil.**

4. Cefalosporine de generaţia a IV-a:

- administrare parenterală: **cefepimă, cefpiromă, cefiderocol**.

5. Cefalosporine de generaţia a- V-a:

- administrare atât *per os* cât şi parenteral: **ceftobiprol, ceftarolină**.

Calea biosintetică propriu-zisă a cefalosporinei. Primele două trepte ale biosintezei penicilinei şi cefalosporinei sunt comune, până la obţinerea izopenicilinei N, şi se desfăşoară în citosol. Izomerizarea acesteia are loc în peroxisomi, iar penicilina N este transferată şi transformată până la cefalosporină C în compartimentul citosolic (**Figura 7**).

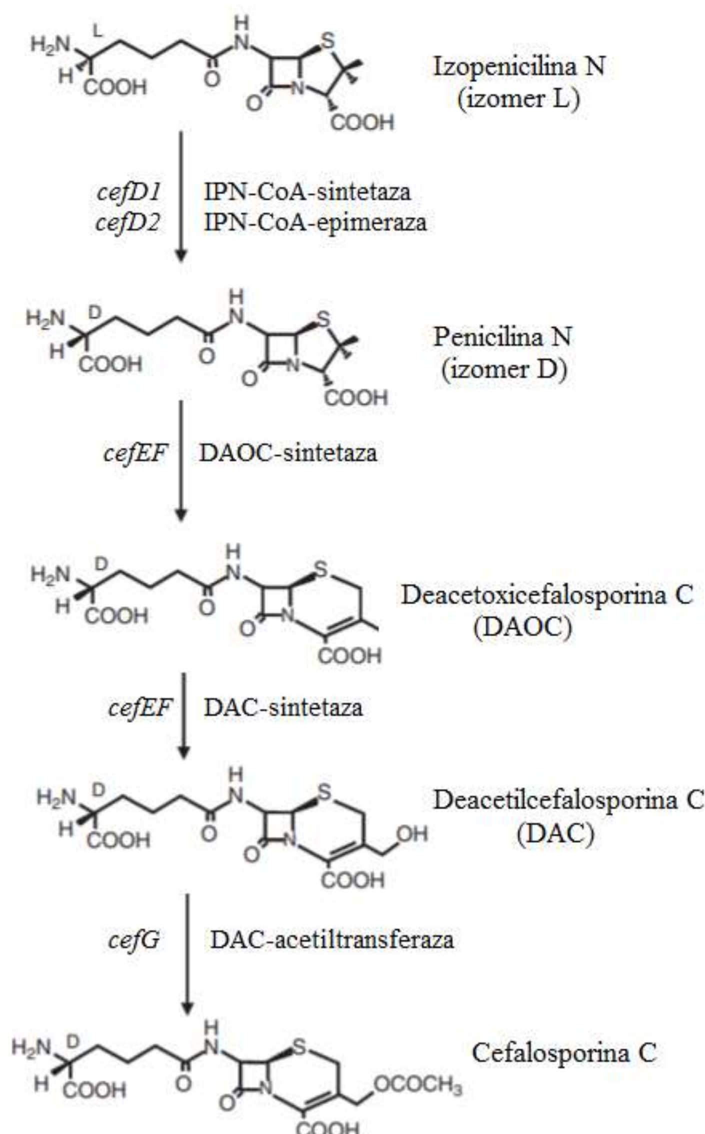


Figura 7. Calea biosintezei cefalosporinei C la *Acremonium chrysogenum*.

Etapele biosintezei cefalosporinei de către *A. chrysogenum:*

I. Condensarea celor 3 aminoacizi precursori, acidul L-α-aminoadipic, L-cisteina şi L-valina în tripeptida ACV (L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina), reacţie catalizată de ACV-sintetază;

II. Închiderea inelului oxidativ al tripeptidei liniare cu formarea structurii inelare biciclice – acidul 6-aminopenicilanic (6-APA), reacţie catalizată de izopenicilin-N-sintetază. Rezultă izopenicilina N (IPN);

III. IPN este transportată în peroxisomi, unde sistemul de epimeraze catalizează izomerizarea lanţului lateral în enantiomer D, rezultând penicilina N;

IV. Penicilina N este transferată din nou în citosol unde, un sistem de enzime bifuncţionale (expandază – hidrolază) convertesc penicilina N în deacetoxicefalosporina C (DAOC) şi ulterior în deacetilcefalosporina C (DAC). Inelul tiazolidinic este convertit în inelul dihidrotiazinic, formând nucleul cefem;

V. În treapta finală DAC este transformat în cefalosporina C, prin acţiunea acetil-CoA şi a acetiltransferazei (Bartoszewska şi colab. 2011; Garcia-Estrada şi Martin 2011).

La *A. chrysogenum*, genele implicate în sinteza cefalosporinei C sunt grupate în cel puţin două clustere, unul iniţial (*pcbAB*, *pcbC, cefD1*, *cefD2, cefM, cefP*, *cefR*) şi unul terminal (*cefEF, cefG*), caracteristice etapelor de biosinteză (**Figura 7**) şi controlate de regulatori pleiotropici: represorul catabolizării carbonului *CreA*, regulatorul de pH *PacC*, gene din complexul velvet *veA*, *LaeA* etc (Martín şi colab. 2010; Hu şi Zhu 2014).

Factori care influenţează biosinteza cefalosporinei C. Cel mai des utilizată este tulpina *A. chrysogenum* 8650, ce produce 4 tipuri morfologice de celule reprezentând stadii ale ciclului de creştere: hife, artrospori, conidii, gemule. Diferenţierea morfologică a lui *A. chrysogenum* pare a fi legată de sinteza cefalosporinei C. Rata maximă a sintezei cefalosporinei C coincide cu conversia fragmentelor hifale la artrospori.

Sinteza cefalosporinei C este influenţată de metionină, arginină, lizină, ornitină, spermină, cadaverină. Adăugarea metioninei în mediul de fermentaţie măreşte semnificativ producţia de antibiotic. Metionina are rol de donor de S pentru sinteza cefalosporinei C, fiind un inductor al anumitor enzime implicate în sinteză (ACV-sintetaza, izopenicilin N-sintetaza sau ciclaza), dar are şi funcţie reglatoare stimulând formarea artrosporilor. Adăugarea compuşilor parafinici în mediul de cultură favorizează formarea de diferite cefalosporine. Sinteza cefalosporinei C de către *A. chrysogenum* pare a fi însoţită de creşterea cantităţii de acid linoleic.

Cefamicina C. Cefamicinele naturale sunt produse de specii ale genului *Streptomyces*, cum este şi cazul cefamicinei C produse de *S. clavuligerus*. Calea biosintetică este comună cu cea a cefalosporinelor, până la obţinerea deacetilcefalosporinei C. Ulterior, DAC suferă o carbamilare, urmată de hidroxilare și transferul unei grupări metil la hidroxilul prezent la C-7 (**Figura 8**).

5.2.4. Obţinerea cefalosporinelor semisintetice

Cefalosporinele naturale au efect antimicrobian redus. Cele utilizate în terapie sunt semisintetice, multe fiind derivate din producţia fungilor din genul *Acremonium*. Pot fi produse însă şi de către tulpini modificate genetic din genul *Penicillium*, în special *P. chrysogenum*, ce pot realiza conversia nucleului tiazolidinic pentaciclic într-unul dihidrotiazinic hexaciclic.

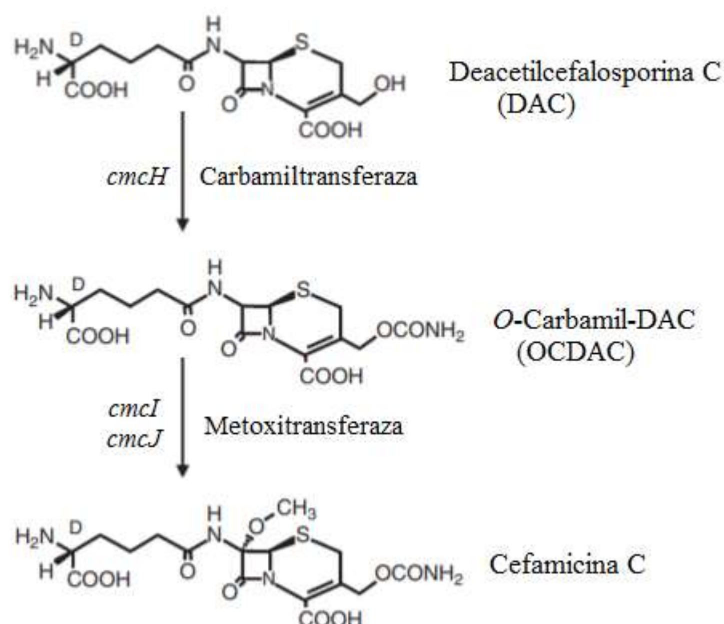


Figura 8. Calea biosintezei cefamicinei C la *Streptomyces clavuligerus.*

Acidul 7-aminocefalosporanic (7-ACA) şi acidul 7-aminodeacetoxicefalosporanic (7-ADCA) sunt doi intermediari utilizați ca substrat pentru obţinerea cefalosporinelor semisintetice. Prin diverse substituții la nivelul radicalilor R1, R2 și R3 în poziţiile 3, 4 şi 7 ale nucleului aminocefalosporanic rezultă compuşi cu acţiune antibacteriană de sute de ori mai mare decât a compușilor naturali și cu toxicitate mai scăzută. Pentru obţinerea cefalosporinelor semisintetice, cele mai importante modificări chimice ale moleculei native sunt:

- dezacilarea cefalosporinelor naturale în scopul obţinerii 7-ACA;
- acilarea grupării 7'-NH_2 din 7-ACA şi obţinerea cefalosporinelor semisintetice;
- modificarea poziţiei 3-acetoxi din cefalosporină;
- transformarea penicilinei în cefalosporine prin extensia ciclului (Conti şi colab. 2014).

Cefalosporine semisintetice derivate din cefalosporina C. 7-ACA este derivat din cefalosporina C, printr-un proces de conversie enzimatică. Convenţional, acesta se desfăşoară în două etape (**Figura 9**), implicând diaminooxidaza (DAO) şi glutaril acilaza (GLA), utilizând tehnica enzimelor imobilizate (Tucaliuc şi colab. 2019). O fuziune a genelor care codifică DAO și GLA a fost exprimată în *E. coli*, obţinându-se o proteină GLA-DAO, capabilă de ambele activități enzimatice, astfel încât catalizează direct conversia cefalosporinei C în 7-ACA (Luo şi colab. 2004). Recent s-a realizat bioconversia cefalosporinei C la 7-APA într-o singură etapă, cu ajutorul cefalosporin C acilazei, o GLA obţinută de la tulpina *Pseudomonas* N176.

Cefalosporine semisintetice derivate din penicilină. Convenţional, 7-ADCA se obţine din penicilina G prin bioconversie catalizată de enzima DAOC-sintetază, o expandază produsă de *Streptomyces clavuligerus*. Condiţiile bioconversiei sunt speciale, astfel încât enzima să nu utilizeze ca substrat penicilina N, pe calea obţinerii cefalosporinei C. Necesită expansiunea chimică a inelului tiazolidinic la inel dihidrotiazinic, proces laborios şi costisitor. Alte modalităţi implică diverse substraturi, precum adipil 7-ADCA, sub acţiunea GLA, sau DAOC, în două etape catalizate de DAO şi GLA (Velasco şi colab. 2000). 7-ADCA constituie materia primă pentru sinteza cefalosporinelor orale din generaţia I.

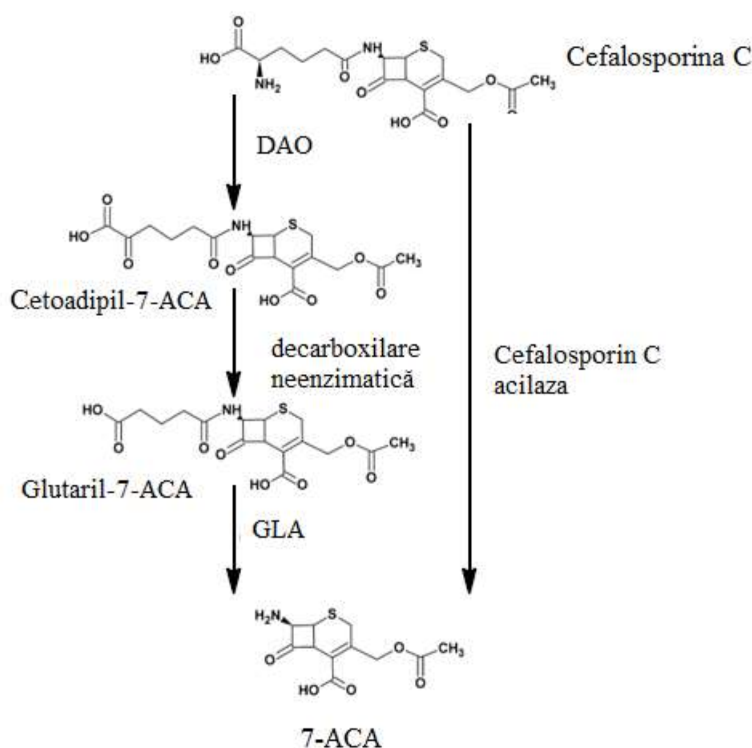


Figura 9. Hidroliza chemo-enzimatică a cefalosprinei C pentru obţinerea 7-ACA.

Biosinteza cefalosporinelor cu tulpini modificate genetic. Aproximativ o treime din cefalosporinele semisintetice disponibile sunt obţinute din 7-ADCA, fiind denumite şi cefalosporine derivate din penicilină. Două treimi provin din 7-ACA. În prezent, piaţa globală a 7-ACA este de peste 4.000 de tone anual, fiind utilizat pentru producerea a peste 50 de cefalosporine semisintetice ce totalizează mai mult de 200 de tone anual. Înlocuirea proceselor de sinteză chimică cu căi biotehnologice au avut beneficii duble, de reducere a costurilor de producţie şi diminuare a problemelor de mediu, principalele obiective urmărite de industria farmaceutică. Diverse strategii aplicate pentru a intensifica biosinteza 7-ACA şi 7-ADCA la *A. chrysogenum* au crescut productivitatea:

- Supraexprimarea genelor *cefEF* şi *cefG* creşte producţia de cefalosporină C şi reduce cantitatea de produşi intermediari sintetizaţi (penicilina N);
- Introducerea de copii multiple pentru supraexprimarea genei *cefT* conferă rezistenţă la acizi organici (acid izovalerianic, acid fenilacetic) şi facilitează transportul extracelular al cefalosporinei (Rodriguez-Saiz şi colab. 2009).

O metodă alternativă de biosinteză a 7-ADCA a fost realizată prin manipularea unei tulpini de *Penicillium chrysogenum*, prin inserţia genei *cefE* de la *Streptomyces clavuligerus* ori a genei *cefEF* de la *A. chrysogenum*. Astfel, un micromicet producător de penicilină poate realiza conversia nucleului tiazolidinic într-unul dihidrotiazinic, specific cefalosporinelor. Suplimentar, exprimarea genei *cefG* de la *A. chrysogenum* conduce la sinteza adipil-7-ACA (Harris şi colab. 2009).

Întrucât peroxisomii permit compartimentarea formării eficiente a metaboliților, a fost avansată ideea că peroxisomii ar putea servi şi drept compartiment pentru desfăşurarea unor căi biosintetice non-peroxisomale, contribuind la îmbunătățirea producției secundare de metaboliți. Alternativ, introducerea enzimelor specializate în peroxisomi poate duce la formarea eficientă a compușilor derivați. De exemplu, introducerea a trei gene, respectiv *cefE* (care codifică

deacetoxicefalosporin-sintetaza la *Streptomyces clavuligerus*) sau *cefEF* (care codifică expandaza – hidrolaza la *A. chrysogenum*) și *cmcH* (care codifică carbamil-transferaza la *S. clavuligerus*) în genomul unei tulpini modificate de *P. chrysogenum* a permis producția de cefalosporine și, respectiv, cefamicine. Lanțul lateral adipoil poate fi îndepărtat din precursor prin cataliză enzimatică în peroxisomi, permițând producția mai ieftină și direcționată a unei varietăți de noi antibiotice semisintetice, care ar putea ajuta la depășirea actualei crize cauzate de rezistența microbiană (Bartoszewska şi colab. 2011).

Extracţia cefalosporinelor. Spre deosebire de penicilină, care este un acid carboxilic, dar asemeni penicilinelor semisintetice, cefalosporinele sunt molecule cu caracter amfoter, având solubilitate ridicată în apă. Aceste proprietăţi îngreunzează extracţia directă cu sovenţi organici. Cefalosporinele se izolează prin schimb ionic, precipitare şi centrifugare. După centrifugare, mediul este acidifiat la un pH scăzut, care distruge (penicilina N) sau converteşte compuşii prezenţi în mediul de cultură (DAC la cefalosporina G).

Spectrul de acţiune al cefalosporinelor

- Generaţia I: spectru antibacterian asemănător aminopenicilinelor, în plus active faţă de tulpinile *Staphylococcus* producătoare de penicilinază, *Klebsiella*, dar inactive pe *Enterococcus*, *Haemophilus*, germeni anaerobi;
- Generaţia II: în plus sunt active faţă de *Haemophilus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*; cefamicinele sunt active faţă de germeni anaerobi şi sunt mai rezistente la beta-lactamaze;
- Generaţia III: mai active pe *Enterobacteriaceae*; ceftazidima şi cefoperazona au activitate şi împotriva *Pseudomona aeruginosa*; lipsite de activitate faţă de *Lysteria monocytogenes*;
- Generaţia IV: active în egală măsură faţă de bacterii Gram-pozitive şi Gram-negative, inclusiv *P. aeruginosa*;
- Generaţia V: ceftobiprolul este activ asupra *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* penicilino-rezistent, *P. aeruginosa* şi a enterococilor; ceftarolina este activă asupra MRSA şi a bacteriilor Gram-pozitive.

5.3. Antibioticele aminoglicozidice

Aminoglicozidele sunt o clasă veche de medicamente antimicrobiene ce rămân o componentă valoroasă a arsenalului de antibiotice, în ciuda toxicității lor inerente și a răspândirii bacteriilor rezistente la acţiunea lor. Sunt substanţe terapeutice obţinute biotehnologic prin exploatarea unor specii de actinomicete, sau sunt produse de semisinteză. Actinomicetele sunt procariote, formează filamente ca şi micromicetele (fungi microscopici) şi rar apar ca celule singulare. Sunt bacterii Gram-pozitive, cele mai reprezentative actinomicete fiind streptomicetele. Genul *Streptomyces* cuprinde 533 specii, după clasificarea atlasului de referinţă Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kampfer 2012).

Antibiotice aminoglicozidice naturale disponibile în terapie:

- **Neomicina** (1949) produsă de *Streptomyces fradiae*
- **Streptomicina** (1952) produsă de *Streptomyces griseus*

- **Kanamicina** (1957) produsă de *Streptomyces kanamiceticus*
- **Paromomicina** (1960) produsă de *Streptomyces rimosus*
- **Gentamicina** (1963) produsă de *Micromonospora echinospora*
- **Tobramicina** (1967) produsă de *Streptomyces tenebrarius*

Prin biosinteză se obţine de regulă un complex antibiotic format din componente distincte cu structură asemănătoare, o componentă majoră şi diferiţi congeneri. Aminoglicozidele conțin unul sau mai multe zaharuri aminate (ex. glucozamină, streptidină, neozamină) (**Figura 10**) conectate prin legături glicozidice de tip amină sau guanidină la un nucleu bazic cu șase atomi de carbon. Acesta este reprezentat de regulă de 2-dezoxistreptamină, cu unele excepţii (ex. streptidină în cazul streptomicinei) (**Figura 11**) (Krause şi colab. 2016).

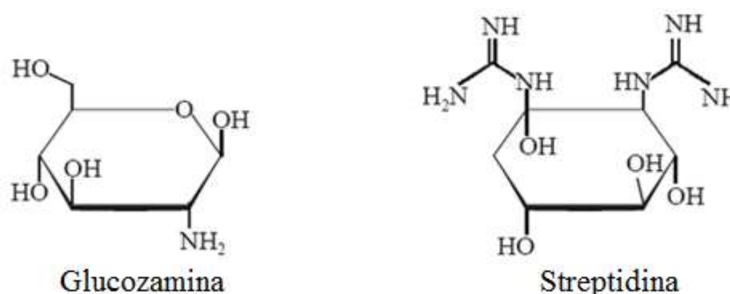


Figura 10. Structura unor zaharuri aminate.

Modul de acţiune. Aminoglicozidele sunt molecule încărcate pozitiv şi interacţionează cu moleculele cu sarcină negativă, cum este ARNr. Astfel, interferează cu subunitatea mică a ribosomilor procariotelor (30S) şi prin urmare cu formarea complexului de iniţiere a biosintezei proteice, determinând o traducere defectuasă a ARNm. Afectează şi ribosomii mitocondriilor care sunt de tip procariot, însă ribosomii de tip eucariot nu sunt afectaţi. Efectul bactericid al acestui mecanism asigură un spectru larg de acţiune. Caracteristica comună a aminoglicozidelor este că **transportul activ dependent de oxigen** este necesar pentru ca antibioticul să traverseze membrana celulară, prin urmare acestea sunt ineficiente împotriva germenilor anaerobi.

5.3.1. Streptomicina

Streptomicina a fost izolată pentru prima oară în anul 1943 de către Albert Schatz. In anul 1944, descoperirea a fost revendicată de Selman Waksmann şi colaboratorii săi, care au arătat că un mediu de cultură conţinând *Streptomyces griseus* avea un efect bactericid puternic asupra germenilor Gram-negativi.

Streptomicina are trei componente legate glicozidic: streptidina, L-streptoza şi N-metil-L-glucozamina. Structura chimică a streptomicinei a fost stabilită prin reacţii de degradare şi studiul produşilor de hidroliză. Prin hidroliză acidă, streptomicina se descompune în două componente bazice: streptidina şi streptobiozamina. Dacă hidroliza are loc în mediu alcalin, din unitatea streptozică se formează maltolul, o substanţă cu proprietăţi slab acide. Streptidina este o bază puternică ce conţine două resturi guanidinice, iar prin hidroliză alcalină pierde CO_2 şi NH_3 transformându-se în streptamină. Streptobiozamina este o dizaharidă aminată care, prin degradare, generează o pentoză ce nu conţine azot numită streptoză şi o hexoză cu o configuraţie sterică puţin obişnuită, N-metil-L-glucozamina (**Figura 11**).

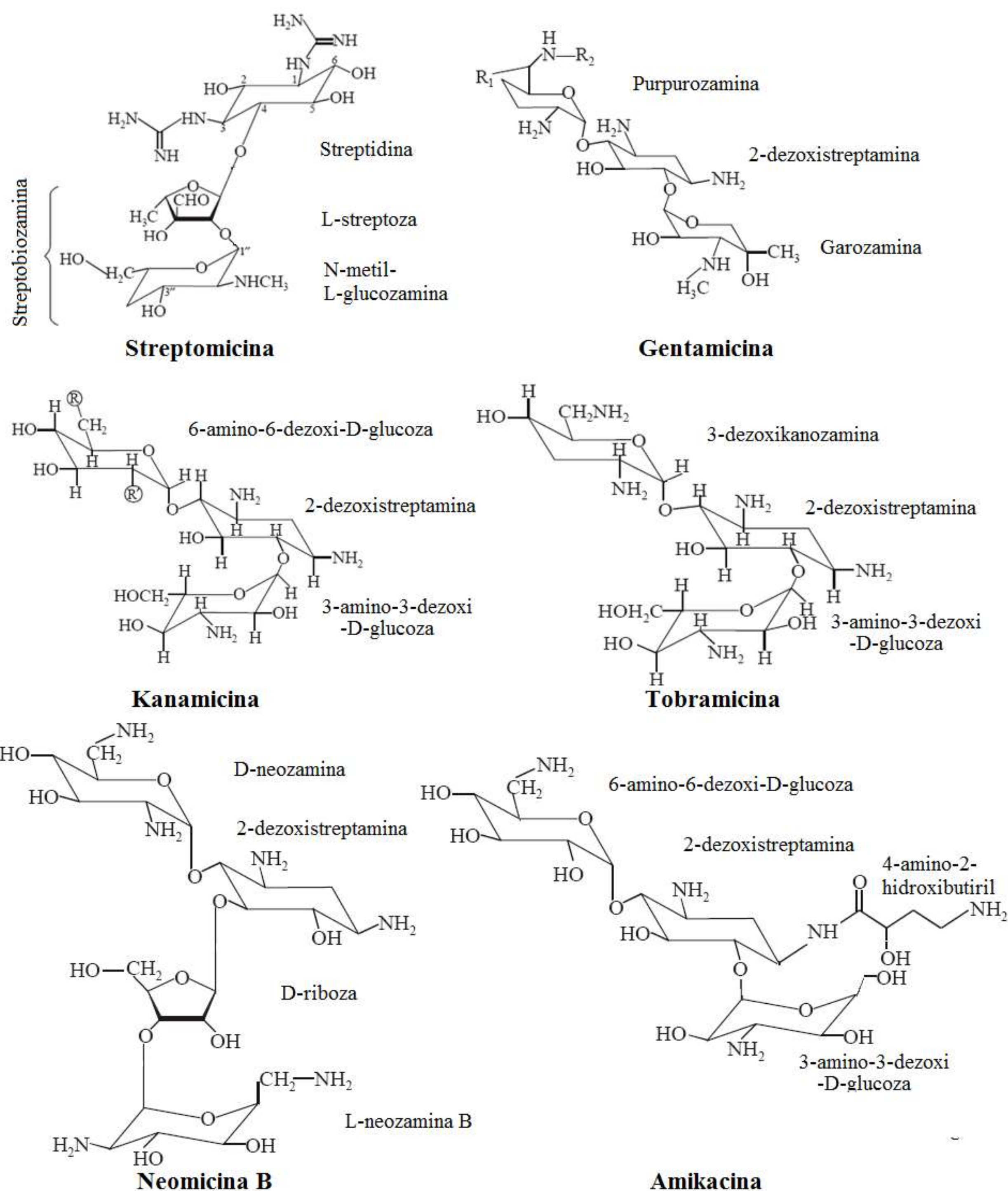


Figura 11. Structura principalelor antibiotice aminoglicozidice

Etapele biosintezei streptomicinei

1. În trofofază biomasa se dezvoltă din nutrienţii mediului de cultură (cu şrot de soia) şi se formează mici cantităţi de streptomicină şi acid lactic;
2. În idiofază se elaborează cea mai mare cantitate de streptomicină;
3. În faza de declin scade cantitatea de streptomicină sintetizată, se opreşte fermentaţia şi are loc autoliza celulelor bacteriene.
4. Fermentaţia are loc la 27-28°C, iar pH-ul iniţial este 7-8,5. Se filtrează mediul de cultură după prelucrarea termică şi chimică (cu acid oxalic), iar coagularea la 50-70°C timp de 30 de minute măreşte viteza de filtrare. Din lichid se separă şi se purifică streptomicina.

5. Streptomicina se caracterizează printr-o bună stabilitate termică, atât în soluţie cât şi în stare uscată, fapt ce permite separarea sa prin atomizare. Purificarea se realizează prin trecerea pe schimbători de ioni, iar eluţia sub formă de sare. Streptomicina este disponibilă de regulă ca triclorură, sare dublă triclorură-clorură de calciu, fosfat sau sulfat de streptomicină, care apar invariabil ca pulbere sau granule. Este mai mult sau mai puțin fără miros, dar are un gust ușor amar. S-a observat că majoritatea sărurilor sunt higroscopice prin expunerea la aer, sunt foarte solubile în apă și practic insolubile în eter, etanol și cloroform. Soluțiile sărurilor streptomicinei sunt levogire.

Calea biosintetică propriu-zisă a streptomicinei. Biosinteza componentelor streptomicinei cuprinde, în esență, sinteza dintr-un component major care este format din streptidină şi streptobiozamină. Acesta este o dizaharidă care constă din două resturi glucidice, L-streptoza şi N-metil-L-glucozamina. S-a descoperit că toate cele trei componente ale streptomicinei sunt derivate exclusiv din D-glucoză (**Figura 12**).

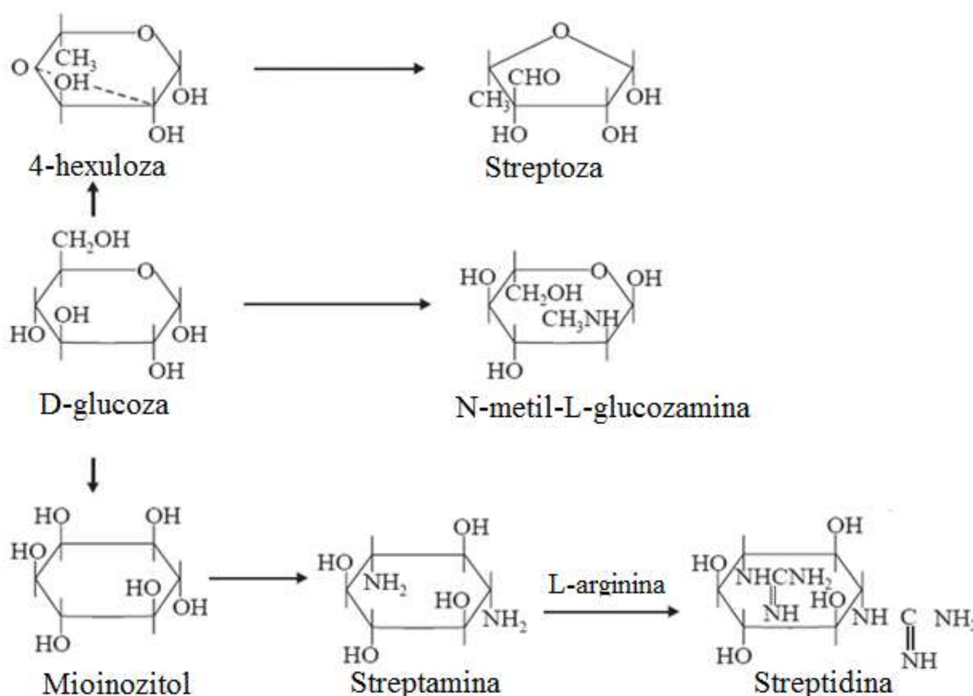


Figura 12. Calea biosintetică de obţinere a componentelor streptomicinei.

Momentan nu este disponibilă nicio dovadă științifică care să ateste modul de atașare a celor trei componente structurale în molecula de streptomicină. Cu toate acestea, pe baza informaţiilor derivate din căile metabolice ale glucozei la acestea, se poate deduce originea biosintetică a componentelor streptomicinei:

I. Streptoza: D-glucoza este transformată mai întâi în 4-hexosuloză, care este apoi rearanjată transannular rezultând streptoza;

II. Streptidina: D-glucoza prin demetilare formează mioinozitol, care prin aminare produce streptamina. Aceasta, în prezența L-argininei conduce în final la formarea streptidinei;

III. N-metil-L-glucozamina: rezultă prin dezoxidare și metil-aminarea D-glucozei.

La streptomicete, custerele de gene *str*-*sts* sunt implicate în biosinteză şi în autorezistenţa la streptomicină. Mecanisme complexe modifică antibioticul (rezistență) prin fosforilare (*strA*) și defosforilare (*strK*). Căile biosintetice implică dehidrataze, epimeraze, fosfataze, dehidrogenaze,

aminotransferaze, transaminaze, fosfotransferaze (*strE*, *strM*, *stsB*, *stsA*, *stsC*, *strB1* sau *strB2*) şi reglarea biosintezei (*strR*, *strS*) (Wehmeier şi Piepersberg 2009).

Activitatea şi spectrul de acţiune al streptomicinei. Streptomicina este activă faţă de germeni Gram-negativi, fiind utilizată mai ales pentru tratarea infecţiilor nosocomiale în care sunt implicate bacterii rezistente la alte antibiotice (cefalosporine, florochinolone), dar şi germeni Gram-pozitivi precum *Staphylococcus aureus* şi *Mycobacterium tuberculosis*. Din cauza dezvoltării rapide a rezistenței în caz de utilizare ca medicație unică, se folosește întotdeauna în scheme polifarmacoterapice. Deoarece nu penetrează intracelular, este activă în principal pe micobacteriile extracelulare. Separat, niciuna dintre componentele streptomicinei nu are acţiune antituberculoasă, activitatea fiziologică se datorează întregii molecule.

Streptomicina pătrunde greu în lichidul cefalorahidian, meningele inflamat fiind mai greu permeabil, dar realizează concentrații terapeutice în lichidul pleural. Se elimină în proporţie de circa 75% pe cale renală. Se administrează doar injectabil, frecvent intramuscular, în doze de 1 gram/zi. Streptomicina se folosește, asociată altor antibiotice şi tuberculostatice, în schemele de terapie inițială a tuberculozei. Este indicată mai ales la bolnavii cu forme severe de tuberculoză (meningita tuberculoasă sau boala diseminată) precum și în tratamentul infecțiilor rezistente la alte medicamente antituberculoase. Prezintă un risc mare de producere a unor reacții adverse, în special în condițiile administrării prelungite, motiv pentru care în prezent este indicată ca medicație de rezervă, doar în tratamentul tuberculozei. Poate produce ototoxicitate, tulburări vestibulare și acustice, nefrotoxicitate, fenomene alergice, erupții cutanate și fenomene iritative radiculare și medulare după administrarea intrarahidiană.

5.3.2. Gentamicina

Gentamicina este obţinută prin fermentație submersă a culturilor de *Micromonospora echinospora (M. purpurea).* Din complexul gentamicinei, compuşii gentamicinei C au cea mai bună activitate antibacteriană, cu efecte secundare reduse. Multiple gene *gmt* şi *gmr* sunt situate într-un cluster ce codifică etapele de biosinteză a gentamicinei (Unwin şi colab. 2004; Ban şi colab. 2019). Cunoaşterea funcţiilor acestora, precum şi a căilor paralele de obţinere a compuşilor gentamicinei a condus la posibilitatea realizării unor tulpini superproducătoare, a unor microorganisme recombinate dar şi la obţinerea unor noi intermediari cu toxicitate scăzută (Yu şi colab. 2017).

Gentamicina se obţine prin fermentaţia în profunzime a *M. echinospora*, cultivate în bulion cu extract de drojdie la 26°C timp de 120-130 ore. Mediul de cultură se acidulează la pH 2 cu H_2SO_4 pentru filtrarea biomasei, filtratul se neutralizează şi se trece în răşini schimbătoare de ioni. Eluarea gentamicinei se face cu acid sulfuric 4-5% iar eluatul se neutralizează şi se concentrează la vid până se reduce volumul de 8-10 ori. Se precipită prin adăugare de acetonă şi acid sulfuric până la pH 5. Sulfatul de gentamicină obţinut se purifică prin dizolvare în metanol, purificare cu cărbune activ şi precipitare cu acetonă sau eter etilic. Produsul obţinut se foloseşte ca atare, având valoare terapeutică ridicată.

Gentamicina este o pulbere amorfă de culoare albă, solubilă în apă şi medii acide, formând săruri. Este moderat solubilă în metanol, etanol, acetonă și aproape insolubilă în benzen și hidrocarburi halogenate. Medicamentul se administrează intravenos, intramuscular sau topic.

Gentamicina prezintă, în esență, o activitate antibacteriană cu spectru larg, fiind în prezent cel mai important antibiotic pentru tratamentul infecțiilor cauzate de stafilococi şi multe bacterii aerobe Gram-negative. Este în mod special eficientă împotriva genului *Pseudomonas*. Bacteriile din acest gen sunt rezistente la alte antibiotice şi constituie o cauză importantă a infecțiilor chirurgicale, cauzând infecţii severe pacienții cu arsuri de gradul trei și infecţii urinare severe. Este utilizată local în tratamentul impetigo, a rănilor infectate, piodermitelor și, de asemenea, în infecțiile oculare externe. Din cauza toxicității, utilizarea sistemică a gentamicinei este limitată la tratamentul infecţiilor de risc major, produse de patogeni din genurile *Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus* și *Pseudomonas*. Controlul efectiv utilizează farmacoterapia antiinfecţioasă combinată, care cuprinde gentamicina împreună cu peniciline sau cefalosporine.

5.3.3. Kanamicina

Sursa biologică de kanamicină este un complex antibiotic produs de *Streptomyces kanamyceticus* Okami & Umezawa. Această tulpină a fost izolată din sol, în Japonia, în anul 1957. Complexul antibiotic este format din trei componente distincte: kanamicina A, componenta majoră, desemnată de obicei ca şi kanamicină şi două componente minore (congeneri), cunoscuţi de obicei sub numele de kanamicină B și C.

Aceste trei antibiotice sunt alcătuite în esență din două aminozaharuri (kanozamină şi 6-amino-6-dezoxi-D-glucoză) care sunt legate în mod individual la un singur aglicon, 2-dezoxistreptamina. În urma procesului de biosinteză rezultă cele trei produse foarte apropiate ca structură: kanamicina A, B şi C. Prin procese de extracţie şi purificare se obţine sulfatul de kanamicină, forma comercială conţinând 98% din acest compus. Multiple enzime codificate de gene *kan, kac* şi *kmr* sunt responsabile de biosinteza kanamicinei (Kharel şi colab. 2004), care poate fi realizată pe căi paralele, ceea ce s-a descoperit şi în cazul altor antibiotice aminoglicozidice precum gentamicina şi apramicina (Yu şi colab. 2017).

Kanamicina este utilizată în tratarea infecţiilor cu *E. coli, Proteus* sp., *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens* sau *Acinetobacter* sp. În cazul infecţiilor cu etiologie necunoscută se administrează injectabil kanamicină, împreună cu o penicilină sau cefalosporină, până la realizarea antibiogramei.

5.3.4. Tobramicina

Sursa biologică de tobramicină este tot un complex antibiotic, produs de *Streptomyces tenebrarius*. Molecula este asemănătoare celei de kanamicină B, diferenţa fiind dată de absenţa unei grupări hidroxil.

Este activă asupra bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) şi a unora Gram-negative, inclusiv *Pseudomonas aeruginosa*. Tobramicina este formulată sub forma picăturilor oftalmice, uneori asociată cu dexametazonă, pentru diverse infecţii oculare. Administrarea sub formă de nebulizare sau injectabilă este indicată în cazul infecţiilor severe.

5.3.5. Neomicina

Sursa biologică de neomicină este un complex antibiotic compus din neomicină A, B și C, obținut din *Streptomyces fradiae*. Cea mai activă este neomicina B, iar neomicina A, rezultată prin hidroliza celorlalte două, are doar 10% din activitatea neomicinei B. Separarea neomicinei din filtratul rezultat în urma biosintezei se face prin neutralizare şi adsorbţie. Se filtrează şi se eluează adsorbitul cu hidroxid de amoniu 10%. Eluatul se trece peste o coloană cu schimbători de ioni care reţine neomicina, iar aceasta se eluează cu acid clorhidric. Soluţia se concentrează iar sarea de neomicină se separă prin atomizare.

Neomicina are o bună activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, dar este foarte ototoxică. Prin urmare, utilizarea sa a fost sever limitată în tratamentul oral al infecțiilor intestinale. Este slab absorbită din tractul digestiv. Se foloseşte în aplicații locale cum ar fi picături auriculare, picături oftalmice și unguente.

5.3.6. Paromomicina

Paromomicina este un antibiotic și antiparazitar din clasa aminoglicozidelor, analog neomicinei. Este produsă de *Streptomyces rimosus*. Optimizarea metodei pentru producerea paromomicinei a condus la creşterea de 14 ori a producției în comparație cu fermentația în mediul bulion cu triptonă şi soia (TSB). Condiţiile optime constau în formularea mediului de cultură (făină de soia 30 g / L, NH_4Cl 4 g / L, $CaCO_3$ 5 g / L și glicerol 40 ml / L), menţinerea pH-ului la un nivel de 6, dimensiunea inoculului de 5,5% v / v, viteza de agitație de 200 rpm, temperatura de 28 °C și un timp de incubație de 8,5 zile (Ibrahim şi colab. 2019).

Paromomicina este disponibilă pentru administrare orală, topică și intramusculară. Este utilizată în tratamentul unor infecții parazitare, precum amoebiaza, leishmanioza, teniaza, criptosporidiaza, giardiaza și altele. Constituie medicamentul de primă intenţie pentru tratarea parazitozelor la gravide. Altfel, este considerat un medicament de rezervă din cauza efectelor secundare ce includ otoxicitate, nefrotoxicitate şi multiplelor interacţiuni medicamentoase.

5.3.7. Obţinerea aminoglicozidelor semisintetice

În efortul global de a combate infecţiile cauzate de patogenii Gram-negativi multirezistenţi, printre antibioticele dezvoltate se numără şi aminoglicozidele semisintetice, cu proprietăţi farmmacologice îmbunătăţite şi toxicitate scăzută.

Obţinerea amikacinei. Lansată comercial în anul 1973, amikacina este un antibiotic semisintetic derivat din kanamicina A. Prezența fragmentului 4-amino-2-hidroxibutiril protejează antibioticul împotriva dezactivării enzimatice, în timp ce activitatea moleculei de bază este menținută. Amikacina se obține prin acilarea funcţiei C-1 amino a grupării 2-dezoxistreptaminei din kanamicină cu acid L-4-amino-2-hidroxibutiric.

Este disponibilă pentru administrare injectabilă, de regulă intavenos şi intramuscular, dar şi intratecal sau intraventricular (în cazuri grave de meningită). Recent a fost introdusă o formă pentru nebulizare, ca suspensie liposomală administrată prin inhalare în cazuri grave de infecţii pulmonare

netuberculoase (complex *Mycobacterium avium*). Nu se administrează pe cale orală. Este un antibiotic valoros în tratamentul infecțiilor grave, de obicei cauzate de bacterii Gram-negative rezistente la gentamicină sau tobramicină. Se recomandă în septicemii, infecții datorate arsurilor, ale tractului urinar, respirator și țesuturilor moi, meningite, peritonite, osteomielite, omfalite la nou-născuți, precum și în alte infecții chirurgicale.

Obţinerea arbekacinei. Arbekacina este un antibiotic semisintetic derivat de dibecacină, analog al kanamicinei. Este disponibilă ca sulfat de arbekacină în formule cu administrare injectabilă în Japonia (1990) şi Coreea (2000). Are activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive (precum MRSA) şi Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), fiind promiţătoare în combinaţie cu antibiotice beta-lactamice împotriva tulpinilor multirezistene de *Pseudomonas aeruginosa* şi *Acinetobacter baumannii*.

Obţinerea plazomicinei. Plazomicina este un antibiotic de generație nouă, analog de gentamicină și derivat de sisomicină. Sisomicina este produsă de actinobacteria *Micromonospora inositola*. Din cauza toxicităţii ridicate, medicamentele cu sisomicină se administrează local şi mai sunt disponibile comercial doar în unele ţări (India). Pentru obținerea plazomicinei, substituenții introduși pe structura sisomicinei sunt un rest de acid hidroxi-aminobutiric în poziția 1 și un rest hidroxietil în poziția 6'. A fost aprobată în anul 2018 în SUA şi în anul 2020 în UE. Este indicată în tratamentul infecțiilor urinare complicate cauzate de *Enterobacteriaceae*. În combinație cu alte antibiotice, plazomicina prezintă o activitate sinergică împotriva unor bacterii Gram-negative extrem de rezistente (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) şi Gram-pozitive multirezistente (MRSA, VRSA).

5.4. Antibioticele glicopeptidice

Antibioticele glicopeptidice sunt esențiale pentru controlul bolilor infecțioase cauzate de bacteriile Gram-pozitive patogene. Patru molecule sunt disponibile pentru uz clinic: produsele naturale **vancomicină** și **teicoplanină**, respectiv medicamentele semisintetice **telavancină** și **dalbavancină**. Vancomicina a fost descoperită în anul 1953, fiind produsă de o bacterie din sol, *Amycolatopsis orientalis*. Teicoplanina, o lipoglicopeptidă sintetizată de *Actinoplanes teichomyceticus* a fost lansată în anii 1980. Telavancina a primit aprobarea FDA în 2009, iar dalbavancina în 2014. Un nou compus, pekiskomicina, a fost obţinut cu ajutorul actinomicetelor şi se află în studii preclinice (Thaker şi colab. 2013).

Glicopeptidele se remarcă prin structură chimică, cale de biosinteză şi mecanism de activitate. Molecula constă dintr-un aglicon heptapeptidic având un schelet compus din aminoacizi proteinogeni (tirozina, leucina, asparagina, alanina şi acidul glutamic) şi din aminoacizi neproteinogeni (4-hidroxifenilglicina, 3,5-dihidroxifenilglicina și β-hidroxitirozina), puternic reticulat şi modificat prin oxidare şi glicozilare (**Figura 13**).

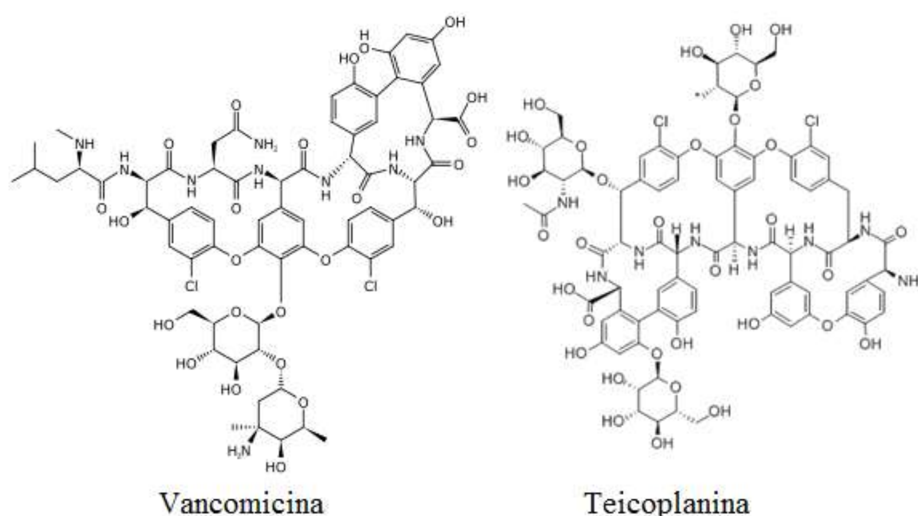


Figura 13. Structura glicopeptidelor naturale.

Biosinteza antibioticelor glicopeptidice. Heptapeptidele sunt sintetizate de peptid-sintetaze non-ribosomale (NRPS), complexe enzimatice multimodulare care îmbină aminoacizii similar unei linii de asamblare. Fiecare modul corespunde unui aminoacid, iar secvența primară a produsului peptidic este dictată de ordinea modulelor NRPS (**Figura 14**). Fiecare modul NRPS poate codifica diferite domenii, inclusiv de condensare (C), adenilare (A), tiolare (T) (denumit şi *peptidyl-carrier protein*, PCP), epimerizare (E) și tioesterificare (Te). Domeniile C, A și T sunt esențiale în fiecare modul, în timp ce un singur domeniu Te termină sinteza și scindează lanțul peptidic din ansamblul NRPS. Domeniile A sunt responsabile pentru recunoaşterea și activarea substratului și, în consecință, secvența lor este utilizată pentru a prezice aminoacidul codificat de modulul corespunzător. Toți intermediarii liniei de asamblare NRPS sunt legați covalent ca tioesteri de brațul 4-fosfopanteteinei. Domeniile C catalizează formarea legăturii peptidice între doi intermediari adiacenți legați de modulul T. Domeniile E convertesc stereochimia aminoacizilor din L- într-un amestec de izomeri D- și L- prin deprotonare și reprotonare. Domeniul C din aval este specific pentru un anumit stereoizomer. Glicopeptidele au diverse aranjamente de module diferite în cadrele deschise de citire (*open reading frame*, ORF) ale NRPS. Multe clustere biosintetice ale antibioticelor glicopeptidice au fost secvențiate, adnotate și caracterizate în ultimii ani prin secvențierea clonelor cosmide sau secvențierea întregului genom (Yim şi colab. 2014).

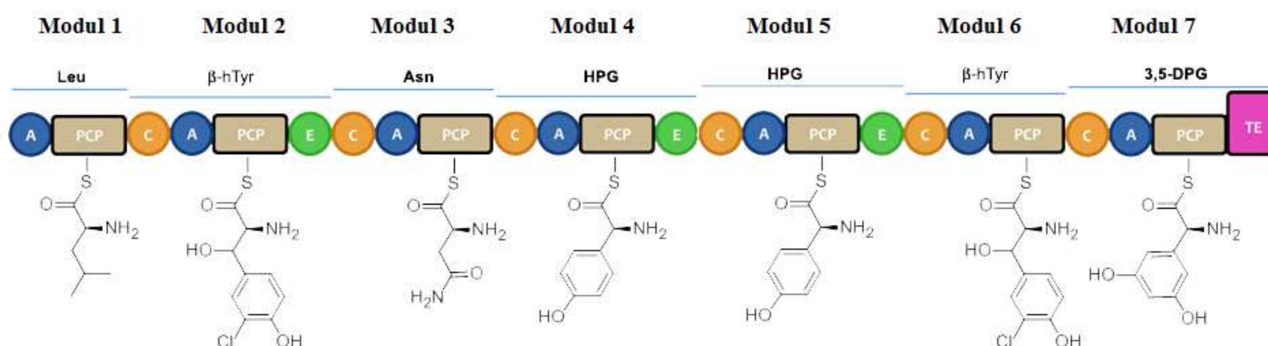


Figura 14. Biosinteza celor şapte peptide ale vancomicinei.

Biosinteza vancomicinei se desfăşoară în principal prin intermediul a trei complexe NRPS (VpsA, VpsB și VpsC), ce determină secvența de aminoacizi în timpul asamblării celor şapte

module în heptapeptidă. VpsA codifică pentru modulele 1, 2 şi 3, VpsB pentru modulele 4, 5 şi 6 iar VpsC pentru modulul 7. Mai întâi sunt sintetizaţi aminoacizii neproteinogeni: inelul 3,5 dihidroxifenilglicină (3,5-DPG) este derivat din acetat, iar L-tirozina este modificată la β-hidroxitirozină (β-HT) şi 4-hidroxifenilglicină (4-Hpg) (van Wageningen şi colab. 1998). După sinteza heptapeptidei, aceasta este transformată dintr-o moleculă liniară într-una reticulată, suferind modificări prin oxidare şi glicozilare sub acţiunea enzimelor citocromului P450 (OxyA, OxyB, OxyC şi OxyD), a metiltransferazei Vmt şi a glicoziltransferazei GftE (Haslinger şi colab. 2015).

Au existat multe încercări de sinteză, atât a agliconului cât şi a heptapeptidei glicozilate. S-a reuşit în final obţinerea sintetică a vancomicinei prin tehnici de ultimă generaţie, în 19 paşi (Moore şi colab. 2020). Această abordare este complicată şi costisitoare, însă deschide calea pentru prepararea sintetică a analogilor modificaţi (prin *pocket-based drug design*), care să abordeze direct mecanismele rezistenței la vancomicină.

Mecanismul şi spectrul de acţiune al antibioticelor glicopeptidice. Molecula hidrofilă a glicopeptidelor acţionează prin formarea unor legături de hidrogen ce blochează legarea polimerilor de acid N-acetilmuramic şi N-acetilglucozamină. Astfel, este inhibată sinteza peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive. Bacteriile Gram-negative sunt intrinsec rezistente la glicopeptide, datorită membranei externe impermeabile. Spectrul de acţiune al vancomicinei este restrâns, asupra enterococilor, streptococilor şi stafilococilor, precum şi a unor specii de *Listeria* şi *Clostridium*. Totuşi, după 30 de ani de utilizare clinică a acestui antibiotic, bacteriile au dezvoltat mecanisme de rezistenţă şi a fost raportată apariţia mai multor tipuri de enterococi rezistenţi la vancomicină (VRE). Genele *van* oferă bacteriilor purtătoare o alterare complexă a sintezei peretelui celular, cu modificarea situsurilor de afinitate pentru antibiotic. Momentan, glicopeptida de semisinteză dalbavancină este eficientă împotriva unor VRE.

5.5. Tetraciclinele

Tetraciclinele sunt un grup de antibiotice cu spectru larg şi cu valoare terapeutică apreciabilă, produse prin cultura unor specii din genul *Streptomyces*. Tetraciclinele fac parte din familia polichetidelor naturale, un grup divers de molecule cu importanţă farmaceutică, derivate din poli-β-cetone. Structura de bază a tetraciclinelor cuprinde un sistem de inele naftacen (sistem ciclic de patru inele condensate liniar), alcătuind un nucleu naftacencarboxamidic (**Figura 15**), similar cu cel al antraciclinelor.

Clortetraciclina a fost primul compus din acest grup, izolat din cultura de *Streptomyces aureofaciens* în anul 1948 de cercetătorul american Benjamin Minge Duggar. A urmat descoperirea **oxitetraciclinei** (1950), obţinută din culturile de *S. rimosus*; şi a **tetraciclinei** (1953), ca un antibiotic minor în amestecul de antibiotice produse de *S. aureofaciens*. Acestea reprezintă **tetraciclinele de primă generaţie**, obţinute prin biosinteză. Diferiţi compuşi asemănători, obţinuţi cu ajutorul actinomicetelor sau prin modificări ale moleculei de bază au condus ulterior la descoperirea multor antibiotice din familia tetraciclinelor.

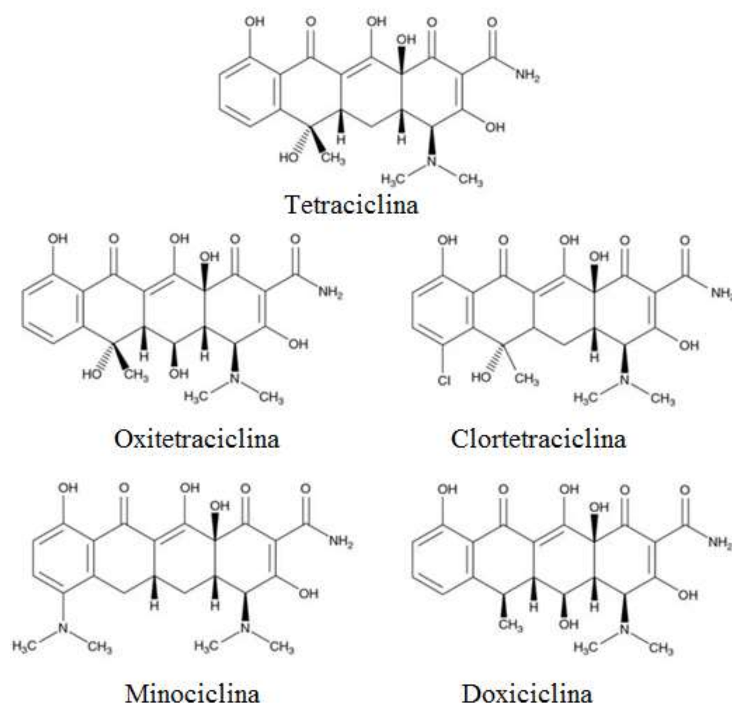


Figura 15. Structura tetraciclinelor.

Calea biosintetică propriu-zisă a tetraciclinelor. Biosinteza tetraciclinelor, în special în ultimele stadii, a fost studiată cu ajutorul tulpinilor mutante. Intermediarii sunt pretetramide, ulterior convertite în tetracicline de tulpina sălbatică de *S. aureofaciens*. Co-sinteza a demonstrat că 4-hidroxi-6-metilpretetramid este un intermediar, precursor de 6-metiltetracicline. Calea biosintetică propriu-zisă a antibioticului presupune:

1. Cultivarea în profunzime a tulpinilor de *S. aureofaciens* în mediu de cultură complex, însă bacteria nu poate utiliza lactoza, maltoza şi sorbitolul. Sursa de C este glucoza sau zaharoza;
2. Fermentaţia prin tehnologie comună obţinerii antibioticelor;
3. Separarea tetraciclinelor din filtrat cu acizi organici, uree sau amoniac;
4. Complexul rezultat fiind insolubil în apă, este tratat cu HCl, rezultând clorhidrat de tetraciclină, se trece pe cărbune activ şi se atomizează, fiind formulat ca soluţie injectabilă;
5. Dacă se urmăreşte obţinerea de tetraciclină, se precipită soluţia de clorhidrat de tetraciclină prin tratare cu amoniac la pH 4;
6. Extracţia cu acetat de butil – metanol (10:1);
7. Purificarea din solvenţi cu apă ultrapură, filtrarea şi deshidratarea.

Mecanismele genetice ale biosintezei au fost investigate în detaliu odată cu secvenţierea clusterului de gene responsabil pentru producerea oxitetraciclinei la *S. rimosus*. Biosinteza este caracterisică polichetidelor de tip II, catalizată de enzime de tipul polichetid sintetazelor (PKS).

Succesiunea etapelor de biosinteză:

I. Obţinerea scheletului poli-β-cetonic prin condensarea unor unităţi starter de malonamil şi amidarea acestuia (enzimele OxyA, OxyB, OxyC, OxyD - PKS, OxyJ);

II. Ciclizarea scheletului tetraciclic (OxyK, OxyN);

III. Metilare şi obţinerea 6-metilpretetramidului (OxyF);

IV. Hidroxilare, amidare, dimetilare rezultând anhidrotetraciclina (OxyL, OxyQ, OxyT);

V. Oxigenare şi dehidrogenare rezultând oxitetraciclina (OxyS, OxyR) (Pickens şi Tang 2009).

Obţinerea tetraciclinelor semisintetice. Deoarece administrarea tetraciclinelor pe cale orală nu permite atingerea rapidă a concentraţiei terapeutice, iar clorhidraţii au o slabă toleranţă generală şi locală, fiind insolubili la pH-ul ţesutului, a apărut necesitatea obţinerii derivaţilor de tetraciclină care să depăşească aceste neajunsuri. Proprietăţi precum activitatea antimicrobiană, solubilitatea, toxicitatea şi biodisponibilitatea au fost îmbunătăţite la **tetraciclinele de generaţia a doua**, precum **doxiciclina, limeciclina** şi **minociclina**, lansate în anii 1960-1970. Importante din punct de vedere clinic, acestea sunt derivate din produşi de fermentaţie, prin semisinteză. Derivaţii solubili de tetraciclină se obţin fie prin substituţii la gruparea carboxamidică (Reacţie Mannich), fie prin modificarea substituenţilor din ciclul naftacenic. Apariţia mecanismelor de rezistenţă genetică a bacteriilor a scăzut eficienţa tetraciclinelor, însă fenomenul se încearcă a fi contracarat de noi antibiotice. Au fost raportaţi o serie de analogi pentaciclici cu activitate antimicrobiană promiţătoare (Sun şi colab. 2011).

A treia generație de tetracicline, cum este **tigeciclina** lansată în anul 2005, sunt obținute pe cale total sintetică, cu mici excepţii (sareciclina). Unii cercetători consideră că tigeciclina este distinctă de alte tetracicline, propunând o nouă familie de molecule antibacteriene numite **glicilcicline** (Greer 2006). Se recomandă în scheme polifarmacoterapice în septicemii critice, dar cu precauţii. Deşi foarte eficientă, administrarea tigeciclinei în monoterapie a fost asociată cu reacţii adverse severe, inclusiv cu risc de deces (Wang şi colab. 2017). O nouă tetraciclină este şi eravaciclina, o florociclină sintetică (Lee şi Burton 2019).

Mecanismul de acţiune şi activitatea tetraciclinelor. În prezent sunt disponibile comercial trei generaţii de tetracicline, cu activitate antibacteriană, antifungică, antivirală şi antitumorală (Fuoco 2012). Tetraciclinele tipice, cum sunt tetraciclina, doxiciclina, minociclina și clortetraciclina sunt antibiotice bacteriostatice care inhibă sinteza proteinelor prin legarea de subunitatea mică ribosomală. Aceste antibiotice inhibă translaţia prin blocarea legării aminoacil-ARNt de complexul ribosom-ARNm. Alte tetracicline au mecanisme atipice cu efect bactericid, fiind foarte toxice atât pentru procariote, cât și pentru eucariote. Tetraciclinele antibacteriene atipice nu au ca ţintă primară ribosomul procariot, ci perturbă membrana celulară, inhibă procesele celulare şi căile de sinteză ale macromoleculelor. Astfel sunt 6-thiatetraciclina, 4-epi-anhidroclortetraciclina, aminometilciclina şi florociclina.

Tetraciclinele sunt antibiotice cu spectru larg, ce acţionează atât asupra bacteriilor Gram-negative cât şi Gram-pozitive, aerobe şi anaerobe. Mulţi germeni au dezvoltat rezistenţă, dar tetraciclinele râmân utile în special în infecţii cu patogeni intracelulari (specii de *Chlamydia, Mycoplasma, Rickettsia*), spirochete (specii de *Treponema, Leptospira, Borrelia*). Sareciclina, un derivat semisintetic al tetraciclinei, aprobată în anul 2018 pentru tratamentul acneei, este un antibiotic cu spectru restrâns ce acţionează în special asupra *Cutibacterium acnes*.

Atât tetraciclinele tipice cât și cele atipice au efecte farmacologice împotriva mai multor tipuri de celule eucariote. Compuşii cu activitate antifungică sunt hipomicetina şi pentaciclina (Fuoco 2012). S-au dovedit de asemenea eficiente în farmacoterapia bolilor inflamatorii, cardiologice şi a infecţiilor virale. Doxiciclina a fost propusă în scheme de tratament în cazul maladiei COVID-19 (Malek şi colab. 2020).

5.6. Macrolidele

Macrolidele constituie grupul cel mai mare de antibiotice, care cuprinde, pe lângă compuşii antibacterieni consacraţi, agenţi cu acţiune antifungică, antiparazitară, antivirală, antitumorală, imunomodelatori şi alte tipuri de molecule cu activităţi mai mult sau mai puţin explorate. Sunt polichetide compuse dintr-un macrociclu lactonic la care pot fi ataşate zaharuri aminate ori neutre. Antibioticele din acest grup sunt naturale, produse de actinomicete, sau semisintetice, cu 12, 14, 15 sau 16 atomi în inelul macrociclic (**Figura 16**). Metimicina produsă de *Streptomyces* sp. este reprezentantul principal al macrolidelor cu 12 atomi în macrociclu. Eritromicina este cel mai cunoscut antibiotic al grupului cu 14 atomi în macrociclu, din care mai fac parte oleandomicina, pikromicina și lankamicina. Azitromicina este cel mai utilizat antibiotic macrolid şi deţine un macrociclu de 15 atomi. Macrolidele cu 16 atomi în macrociclu sunt tilozina, carbomicina și nidamicina.

Exemple de antibiotice macrolide naturale disponibile în terapie:

- **Eritromicina** (1952) produsă de *Saccharopolyspora erythraea* (anterior *Streptomyces erythreus*);
- **Carbomicina** (1953) produsă de *Streptomyces halstedii*;
- **Oleandomicina** (1954) produsă de *Streptomyces antibioticus*, doar pentru uz veterinar;
- **Spiramicina** (1955) produsă de *Streptomyces ambofaciens;*
- **Tilozina** (1961) produsă de *Streptomyces fradiae*, pentru uz veterinar;
- **Josamicina** (1982) produsă de *Streptomyces narbonensis*;
- **Midecamicina** (1988) produsă de *Streptomyces mycarofaciens*.

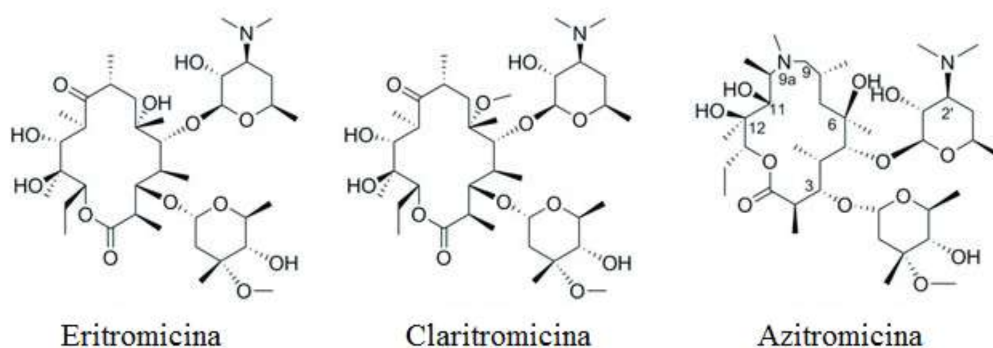


Figura 16. Structura antibioticelor macrolide.

Biosinteza pikromicinei. Primul compus descoperit în anul 1950 de către Brokmann și Hekel a fost pikromicina (gr. *pikro* = amar), sintetizată de *Streptomyces venezuelae*. Aceast candidat nu a avansat la utilizarea clinică, dar rămâne în continuare un precursor important pentru sinteza altor macrolide și derivați.

Exprimarea metaboliţilor secundari precum pikromicina este intensificată în faza de diferenţiere a sporilor. Calea biosintezei (calea macrolidelor metimicină / pikromicină) realizată de enzime multidomeniale sau complexe enzimatice reprezintă un sistem metabolic robust pentru analiza biosintezei polichetidelor modulare. Aceste enzime PKS prezintă o flexibilitate fără

precedent a substratului, combinându-se pentru a produce șase antibiotice macrolide structurate în *S. venezuelae*. Calea biosintetică cuprinde 18 gene distincte, grupate în 5 loci separați, care sunt responsabili pentru generarea a 6 antibiotice macrolide diferite. Locusul *pikA* codifică o PKS de tip I care direcționează biosinteza macrolactonelor cu 12 și 14 atomi, precum 10-dezoximetinolida și narbonolida. Locusul *des* codifică toate proteinele responsabile de generarea fragmentului desozaminic și atașarea la macrolactonele 10-dezoximetinolidă şi narbonolidă pentru a genera macrolidele YC-17 și narbomicină. *PikC* este o monooxigenază a citocromului P450 care servește la hidroxilarea macrolidelor YC-17 și narbomicină, generând metimicină, neometimicină, novametimicină, pikromicină, neopikromicină și novapikromicină. Locusul *pikR* conține două gene de rezistenţă (*pikR1* şi *pikR2*) la macrolide-lincosamide-streptogramine B (MLSB), care asigură autoprotecție bacteriei producătoare. Gena *pikD* codifică un factor de reglare transcripțională (**Figura 17**) (Kittendorf şi Sherman 2009).

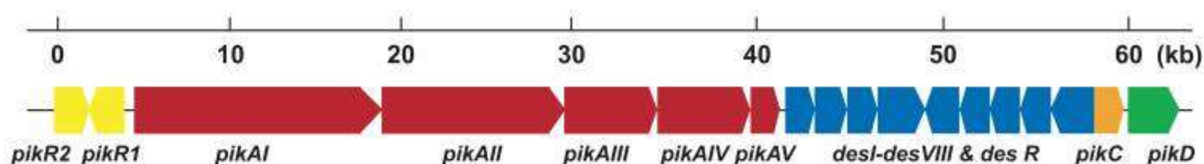


Figura 17. Clusterele de gene implicate în calea biosintetică metimicină / pikromicină la *S. venezuelae* (după Kittendorf şi Sherman 2009).

Clonarea și exprimarea genelor căii biosintetice metimicină / pikromicină au permis identificarea mecanismelor de sinteză a macrolidelor. Se ia în considerare faptul că enzimele biosintetice ale pikromicinei ar putea fi folosite pentru producția cu randament ridicat de noi macrolide. Identificarea clusterelor de gene implicate în biosinteză a fost simplificată de apariţia tehnicilor de analiză a genomului și a secvențierii de ultimă generaţie, însă unele gene sunt derivate din organisme necultivabile sau din microorganisme greu de supus manipulării genetice și, prin urmare, nu sunt uşor exprimate pentru identificarea unor compuşi țintă. Pentru a depăși astfel de limitări intrinseci și pentru a obține exprimarea funcțională a căilor biosintetice pentru obţinerea produşilor naturali cu potențial farmaceutic, au fost urmărite strategii de exprimare heterologe. Bibliotecile cosmide (ce utilizează vectori hibrizi conţinând genom din plasmidă şi secvenţa *cos* a fagului λ) sau fosmide (ce utilizează vectori hibrizi conținând genom din plasmidă și secvența factorului de fertilitate) au permis exprimarea heterologă a unor clustere de gene responsabile de biosinteza unor molecule naturale la actinomicete. Recent, au fost introduse mai multe abordări sofisticate precum sistemul de recombinare omologă liniar plus liniar (*linear plus linear homologous recombination*, LLHR), sistemul de recombinare asociată transformării (*transformation-associated recombination*, TAR) și sistemul de cromosom artificial bacterian *Streptomyces* (pSBAC). Integrarea în tandem a pSBAC în *S. lividans* a dus la o productivitate semnificativ îmbunătățită pentru 10-deoximetinolidă și pikromicină, concluzionându-se că acest sistem ar putea constitui o strategie eficientă pentru supraexprimarea funcțională a întregului cluster de gene biosintetice a oricărui metabolit potenţial valoros, produs cu titru scăzut în actinomicete (Pyeon şi colab. 2017).

5.6.1. Eritromicina

Primul macrolid de succes comercial, eritromicina, a fost descoperit de o echipă de cercetători de la Eli Lilly într-o probă de sol prelevat din Filipine. La 30 de ani de la descoperire, în anul 1981, sinteza chimică a eritromicinei a fost raportată de către echipa de cercetători condusă de Robert Burns Woodward. Laureat al Premiului Nobel pentru Chimie în 1965, Woodward a realizat sinteza a numeroase molecule organice complexe, printre care chinina, colesterolul, stricnina, cortizonul, cefalosporina, cobalamina etc. Deşi noi căi alternative ale sintezei sunt în continuare identificate şi perfecţionate, modalitatea cea mai rentabilă de producţie a eritromicinei rămâne cea biotehnologică.

Variabilitatea genetică a tulpinilor de *Saccharopolyspora erythraea* înalt producătoare impune utilizarea tulpinilor liofilizate sau un efort continuu pentru reizolarea acestor tulpini pe medii agarizate. Utilizarea tulpinilor valoroase asigură o productivitate ridicată a eritromicinei A (circa 8 g/l) cu o puritate >90% şi un titru scăzut de produse secundare, în principal eritromicină B și C. A fost realizată producţia eritromicinei A în tulpini recombinate de *E. coli*, ce asigură un titru de 10 mg/l (Zhang şi colab. 2010). Eritromicina este obţinută prin fermentație submersă a inoculului de bacterii sporulate la 34ºC, pH 7,2 în mediu de cultură conţinând amidon de porumb, făină de soia, dextrină (poate fi glucoză sau melasă), NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, ulei de soia şi $CaCO_3$, suplimentat periodic cu propanol. Fermentaţia durează 5-7 zile. Eritromicina este uşor degradabilă în mediu puternic acid sau alcalin, extracţia ei realizându-se prin separare cu solvenţi organici, purificare şi cristalizare. S-au perfecţionat metode mai eficiente incluzând tehnici de adsorbţie, ultrafiltrare, micele reversibile etc.

Bacteria *Saccharopolyspora erythraea* produce în mod nativ eritromicină A, un polichetid ramificat polioxigenat. Clusterul de gene cromosomale responsabil de biosinteză totalizează aproximativ 55 kb, fiind compus din trei gene mari pentru PKS (*eryAI*, *eryAII*, *eryAIII*) și 17 gene suplimentare responsabile pentru biosinteza zaharurilor, asamblarea moleculei macrolidei și autorezistență. În timpul biosintezei sunt produşi o serie de congeneri, eritromicina A fiind compusul cel mai abundent şi activ biologic (Zhang şi colab. 2010).

I. În prima etapă a biosintezei, condensarea a 6 molecule de metilmalonil-CoA cu o moleculă de propionil-CoA conduce la formarea unui aglicon macrociclic, 6-deoxi-eritronolid B (6-dEB). Asamblarea este controlată de un complex PKS de tip I, compus din trei proteine modulare denumite 6-dEB sintetaze (DEBS), codificate de cele trei gene mari. Fiecare subunitate homodimerică DEBS conţine două module proteice, iar intermediarii biosintezei rămân ataşaţi PKS, fiind transportaţi în lanţul DEBS de la un modul la altul.

II. În cea de a doua etapă, o serie de enzime ale citocromului P450 catalizează o suită de reacţii. Hidroxilarea (EryF) şi glicozilarea (EryBV şi EryCIII) 6-dEB conduc la eritromicina D, primul intermediar ce manifestă activitate antimicrobiană. În continuare, două căi alternative conduc la formarea produsului final. Cea mai importantă cale presupune hidroxilarea (EryK), rezultând eritromicina C şi în final metilarea (EryG) acesteia obţinându-se eritromicina A. Calea alternativă are loc la o rată mai scăzută şi presupune mai întâi metilarea (EryG) eritromicinei D, rezultând intermediarul eritromicină B (**Figura 18**).

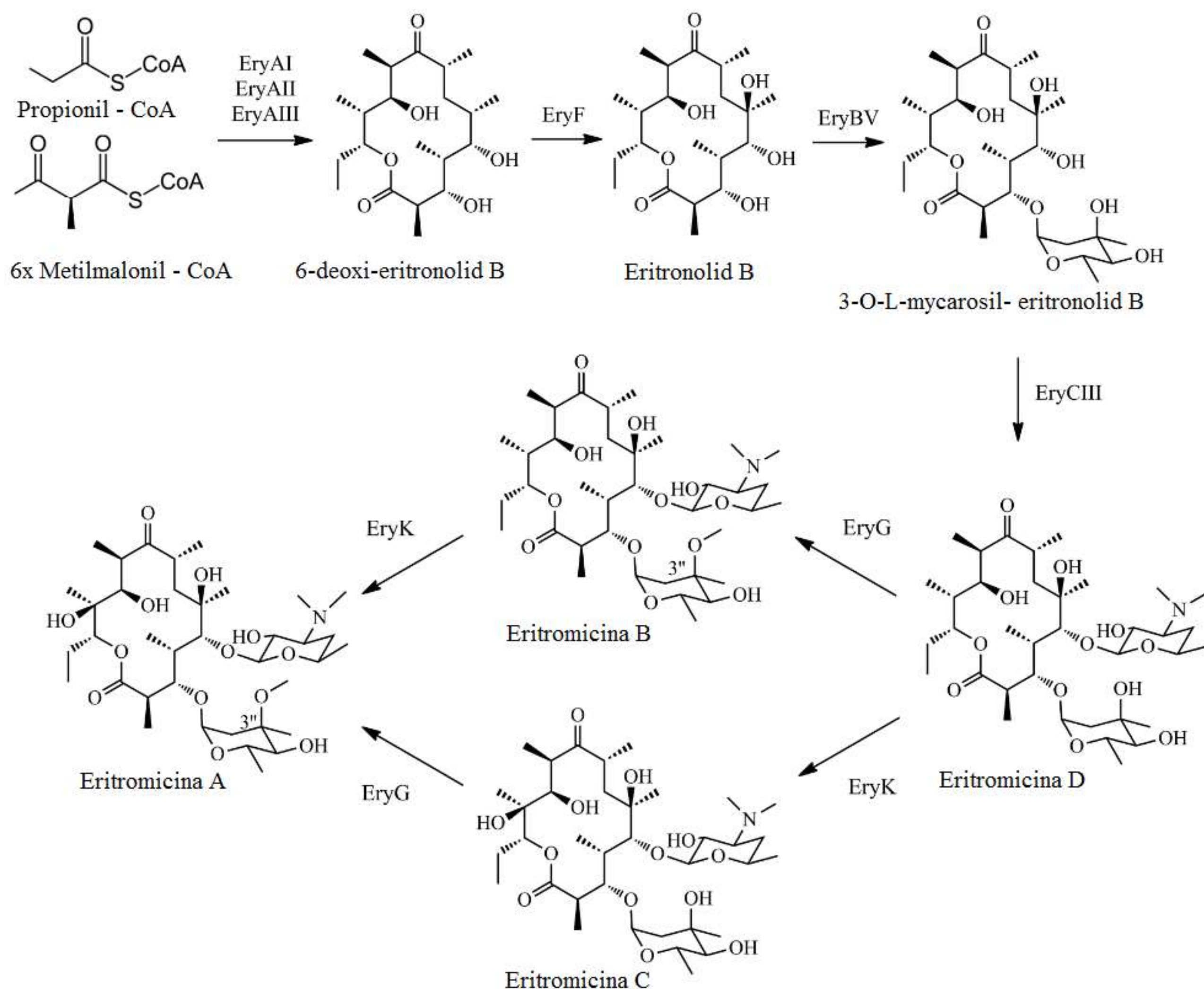


Figura 18. Biosinteza eritromicinei (după Chen şi colab. 2014; Musiol-Kroll şi Wohlleben 2018).

Mecanismele genetice şi enzimatice au fost descifrate, iar căile biosintetice sunt în continuare intens explorate, întrucât polichetidele în general constituie molecule de interes farmaceutic, obţinute majoritar din surse biologice. Unii compuşi ar putea fi sintetizaţi chimic, însă cu randament scăzut, PKS oferind multe soluţii (Cane 2010; Mussiol-Kroll şi Wohleben 2018). Clusterul de gene responsabil de sinteza eritromicinei A la *S. erithraea* a fost transferat la gazde heterologe precum *E.coli* (Zhang şi colab. 2010) sau alte specii de *Streptomyces* (Fayed şi colab. 2015), ce au demonstrat că pot produce antibioticul, dar şi analogi ai eritromicinei. Totuşi, complexitatea sistemului de biosinteză nu este pe deplin înţeleasă, dar este relevantă pentru dezvoltarea acestui grup important de compuşi farmaceutici prin inginerie raţională şi biosinteză combinatorială. Au fost indentificate şi alte specii de actinomicete capabile să sintetizeze diverse eritromicine, precum *Aeromicrobium erythreum* (Miller şi colab. 1991), actinomicetul halofil *Actinopolyspora erythraea* (Chen şi colab. 2014) sau actinobacteria alcalofilă *Streptomyces werraensis* (Sanghvi şi colab. 2014).

5.6.2. Macrolidele semisintetice

Deşi macrolidele naturale au o foarte bună activitate antimicrobiană, printre dezavantajele lor sunt biodisponibilitatea scăzută, farmacocinetica imprevizibilă şi stabilitatea redusă în mediu

acid. Dezvoltarea **macrolidelor de generaţia a doua** a condus la compuşi cu proprietăţi îmbunătăţite. Primul macrolid semisintetic, **troleandomicina** (1958), este un ester acetilat derivat din oleandomicină ce a fost retras de pe piaţă în majoritatea ţărilor din cauza interacţiunilor medicamentoase. Macrolidele semisintetice derivate din eritromicină cele mai utilizate în prezent sunt **claritromicina** (1980) şi **azitromicina** (1988). În unele ţări sunt disponibile **roxitromicina** (1987), **fluritromicina** (1990) şi **diritromicina** (1993).

Ulterior, utilitatea clinică a macrolidelor a scăzut datorită înregistrării fenomenului de rezistenţă la aceste antibiotice. Multe bacterii rezistente conțin enzime care metilează ARNr 23S, o modificare care reduce foarte mult afinitatea ribosomilor pentru macrolide. Alterarea ţintei este cauzată şi de mutaţii ale genei ARNr. Designul raţional a condus la apariţia **macrolidelor de generaţia a treia**, **ketolidele**, un grup de macrolide derivate din eritromicină care deţin o grupare 3-ceto ataşată inelului lactonic. Această modificare permite un spectru de acţiune mai larg. Singurul ketolid disponibil pe piaţă este **telitromicina** (2001), indicat doar în cazuri grave de pneumonie din cauza reacţiilor adverse severe.

Alte molecule aflate în dezvoltare sunt **solitromicina** şi **cetromicina**, care au dovedit ca sunt sigure, însă producătorii nu au manifestat interes pentru lansarea lor pe piaţă, ambele fiind indicate pentru tratamentul pneumoniei cauzate de inhalarea sporilor de *Bacillus anthracis*. Totuşi, cetromicina are statut de medicament orfan pentru această indicaţie. Solitromicina este un **floroketolid**, considerat de unii autori ca fiind un **macrolid de generaţia a patra** (Fernandes şi colab. 2017). Un nou ketolid aflat în cercetare clinică este **nafitromicina**.

Compania farmaceutică Pliva, care a patentat azitromicina, se remarcă printr-un interes deosebit pentru cercetarea şi dezvoltarea macrolidelor. Echipa de cercetători croaţi a descoperit o nouă clasă de macrolide, denumite **macrolone**, un grup de esteri derivaţi prin fuziunea moleculei macrolidice cu o chinolonă. Rezultatele studiilor preclinice indică o bună activitate antimicrobiană, urmărindu-se dezvoltarea de antibiotice eficiente împotriva germenilor rezistenţi (Paljetak şi colab. 2016).

Mecanismul de acţiune al macrolidelor. Macrolidele au efect bacteriostatic, inhibând sinteza proteinelor prin legarea de ARNr 23S al subunităţii mari a ribosomului procariot (50S) în regiunea asociată peptidil-transferazei. Legarea antibioticului blochează canalul de ieşire al peptidei. Suplimentar, inhibă sinteza proteinelor când lanţul peptidic ajunge la o lungime de 5-11 aminoacizi, blocând formarea legăturilor peptidice şi extinderea lanţului de aminoacizi, şi antrenând disocierea de ribosom a complexului peptidil-ARNt. La procariote, principala componentă nucleotidică a situsului de legare este adenina (A2058), iar selectivitatea macrolidelor se datorează faptului că nu se leagă de guanină, care este nucleotida corespunzătoare la eucariote. În ultimii ani, datele referitoare la efecte adverse iau în considerare cardiotoxicitatea macrolidelor, ca urmare a afectării mitocondriilor din cardiomiocite. Unele macrolide precum azitromicina acţionează printr-un mecanism de legare dublă la molecula ARNr 23S, blocând suplimentar canalul de ieşire a lanţului de aminoacizi. În funcţie de concentraţie, ketolidele precum telitromicina manifestă efect bactericid (Dinos 2017).

Spectrul de acţiune al macrolidelor. În general, macrolidele de primă generaţie au un spectru antimicrobian larg, în special asupra bacteriilor Gram-pozitive, dar şi Gram-negative ce cauzează infecţii ale tractului respirator: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus pyogenes*, *S.*

pneumoniae, Bacillus anthracis, Bordetella sp., *Haemophilus influenzae, Legionella pneumoniae*. Eritromicina este administrată pacienţilor cu alergii la peniciline. În plus, macrolidele semisintetice acţionează eficient împotriva bacteriilor anaerobe, atipice şi intracelulare, fiind recomandate într-o gamă largă de infecţii respiratorii, digestive, urinare şi genitale cu germeni precum: *Chlamydia* sp., *Clostridium* sp., *Haemophilus* sp., *Mycoplasma* sp., complexul *Mycobacterium avium, Neisseria* sp., *Prevotella* sp., dar şi în scheme de triplă farmacoterapie a infecţiilor cu *Helicobacter pylori*. Farmacocinetica indică faptul că macrolidele de acumulează în neutrofile şi macrofage, având rol antiinflamator şi stimulând sinteza citokinelor. Telitromicina difuzează în ţesuturi şi în fagocite, iar concentraţia tisulară atinge un nivel ridicat la locul infecţiei.

5.6.3. Tiacumicinele

Tiacumicinele reprezintă un grup de antibiotice mai nou descoperit, ce aparţine familiei macrolidelor. Se cunosc peste 40 de compuşi, caracterizaţi printr-un inel macrociclic cu 18 atomi. **Fidaxomicina** este unicul compus disponibil pentru terapie, lansat pe piaţă în anul 2011. Fidaxomicina (tiacumicina B, lipiarmicina A3) conţine un aglicon central cu 18 atomi, două reziduuri de ramnoză şi o grupare de acid homoorselinic diclorurat (**Figura 19**). Este produsă de actinomicetul *Dactylosporangium aurantiacum* ssp. *hamdenesis*, dar şi de alte specii precum *Actinoplanes deccanensis, Micromonospora echinospora* ssp. *armeniaca* sau *Catellatospora* sp. La *D. aurantiacum*, clusterul *tia* conţine 31 de gene implicate în biosinteza tiacumicinei B: patru gene responsabile pentru PKS modulare de tip I, asemănătoare DEBS la sinteza eritromicinei, care iniţiază biosinteza agliconului de la propionil-CoA; trei gene responsabile de sinteza şi modificarea grupării aromatice (acid homoorselinic); gene responsabile de biosinteza precursorilor; gene pentru biosinteza şi modificarea grupărilor glucidice; gene pentru hidroxilazele citocromului P450; gene reglatoare, responsabile de autorezistenţă şi transport (Xiao şi colab. 2011).

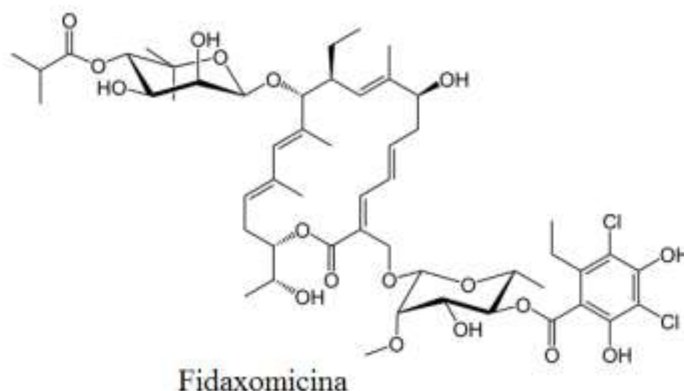


Figura 19. Structura fidaxomicinei.

Mecanismul de acţiune al fidaxomicinei. Spre deosebire de alte antibiotice macrolide, fidaxomicina nu intervine în sinteza proteinelor ribosomale. Fidaxomicina blochează sinteza ARN, inhibând procesul de transcriere catalizat de ARN polimeraza bacteriană. Antibioticul se leagă de ARN polimerază înainte de începerea sintezei ARN, blocând disocierea ADN dublucatenar. Acest mecanism este diferit de cel al altor antibiotice ce afectează sinteza ARN, precum rifampicina (Artsimovitch şi colab. 2012).

Spectrul de acţiune al fidaxomicinei. Tiacumicinele sunt antibiotice cu spectru restrâns. Fidaxomicina manifestă un efect antimicrobian excelent asupra germenilor Gram-pozitivi de tipul stafilococilor şi enterococilor, inhibând formarea sporilor şi producţia toxinei la *Clostridium difficile*. Este aprobată pentru tratarea infecţiilor cu *C. difficile*, un patogen ce cauzează diarea nosocomială. Antibioticul are avantajul că perturbă în mică măsura microbiota normală a tubului digestiv.

5.7. Lincosamidele

Lincosamidele constituie un grup relativ mic de antibiotice cu o structură chimică formată din porțiuni de aminoacizi și un zahar. Structural, lincosamidele sunt compuse dintr-un miez atipic de tiooctoză de care se leagă o grupare alchilprolină (**Figura 20**). Lincosamidele naturale, **lincomicina** și **celesticetina**, sunt produse de mai multe specii de *Streptomyces*, în principal de *S. lincolnensis, S. roseolus* și *S. caelestis* și de *Micromonospora halophytica*. Celesticetina prezintă 5% din activitatea biologică *in vivo* a lincomicinei. Lincomicina a fost introdusă în practica terapeutică în anul 1964, în prezent fiind utilizată rar la om şi mai mult în medicina veterinară, mai ales animalelor de companie, datorită unor efecte adverse asupra tractului gastrointestinal. Au fost preparați o serie de derivați semisintetici ai lincomicinei, dintre care **clindamicina**, un derivat clorurat, este principalul antibiotic lincosamidic, aprobat în anul 1968.

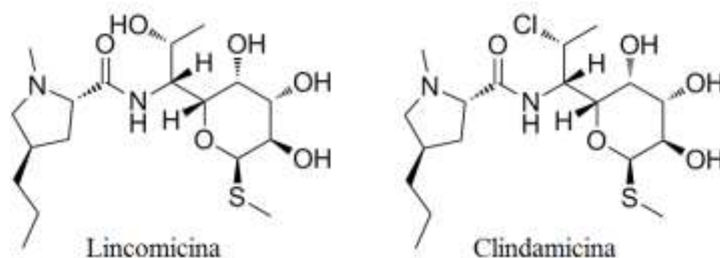


Figura 20. Structura principalelor lincosamide.

Biosinteza lincomicinei. Căile biosintezei lincomicinei şi celesticetinei sunt similare, însă nu au fost pe deplin elucidate. Molecula complexă de lincomicină se formează pe o cale biosintetică bifurcată, care conduce la 6-amino-6,8-dideoxi-1-tio-D-eritro-α-D-galactooctopiranozidă și 4-n-propil-L-prolină. Pentru formarea lincomicinei, aceste două produse sunt condensate, urmând etapa finală de metilare (Novotna şi colab. 2013). Tiooctoza denumită metiltiolincosamidă se formează prin condensarea moleculelor de riboză-5-fosfat cu fructoză-6-fosfat, iar gruparea poliprolinică este derivată din L-tirozină. Se presupune că formarea grupării poliprolinice este mediată de NRPS atipice (Janata şi colab. 2015). Clusterul de gene responsabil de biosinteza lincomicinei la *S. lincolnensis* a fost parţial caracterizat, acesta conţinând 29 de gene *lmb* cu funcţie biosintetică şi reglatoare şi trei gene de rezistenţă *lmr* (Lin şi colab. 2020).

Mecanismul de acţiune al lincosamidelor. Mecanismul de acţiune al lincosamidelor este similar celui specific macrolidelor şi streptograminelor, constând în blocarea sintezei proteinelor microbiene prin legarea de subunitatea mare a ribosomului procariot (50S). Efectul bacteriostatic se datorează atât blocării iniţierii lanţului peptidic, cât şi stimulării disocierii complexului peptidil-ARNt de ribosom. La concentraţii mari, aceste antibiotice pot avea efect bactericid. Situsul de

legare, situat în apropierea centrului peptidil-transferazei, este similar macrolidelor şi cloramfenicolului, ceea ce conduce la scăderea eficacităţii în cazul combinării acestor antibiotice. Modul principal de rezistență la lincosamide este modificarea ARNr 23S, înregistrându-se un fenomen de rezistenţă încrucişată la macrolide, lincosamide şi streptogramină B (rezistență la MLSB).

Spectrul de acţiune al lincosamidelor. Macrolidele şi lincosamidele sunt antibiotice de primă linie utilizate în medicina veterinară, în infecţii stafilococice şi streptococice. Lincosamidele sunt administrate la pacienții care nu pot utiliza penicilină, cefalosporină și macrolide, pentru prevenirea infecțiilor intraabdominale după intervenții chirurgicale, în infecții stomatologice, sepsis anaerob și în special a infecțiilor osoase și articulare. Clindamicina este administrată în infecţii cauzate de germeni anaerobi precum *Bacteroides fragilis* şi unele specii de *Clostridium*, însă nu este activă asupra bacteriilor Gram-negative precum *E. coli*, *P. aeruginosa*, etc. Este activă şi asupra unor protozoare, fiind utilizată preventiv sau curativ în toxoplasmoză, malarie şi babesioză (Spížek şi Řezanka 2016).

5.8. Streptograminele

Streptograminele constituie o familie de antibiotice inedite, ce rezidă într-un amestec a două substanțe diferite din punct de vedere chimic: streptograminele din grupul A, care sunt mactolactone polinesaturate, aparținând familiei de antibiotice de tip polichetide, și streptograminele din grupul B, reprezentate de hexadepsipeptide ciclice, aparținând familiei de antibiotice de tipul peptidelor non-ribosomale. Ambele substanțe sunt sintetizate într-un raport de 70:30 de către tulpinile producătoare de streptomicete şi bacterii din genurile *Actinomadura* sau *Micromonospora*, ori de micromicete precum *Actinoplanes* sp.

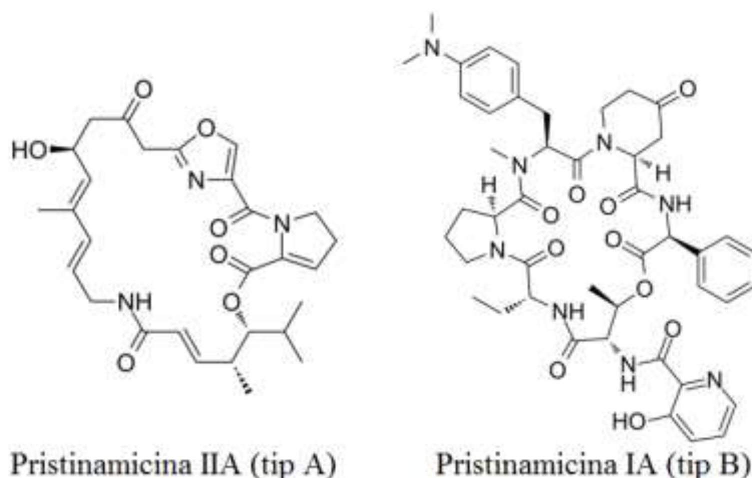


Figura 21. Structura celor două componente ale pristinamicinei.

În prezent, cele mai importante streptogramine naturale disponibile comercial sunt **pristinamicina** (**Figura 21**) și **virginiamicina**. Prima streptogramină, virginiamicina, a fost izolată în 1952 dintr-o tulpină de *Streptomyces virginiae*. Se aplică ca supliment în hrana animalelor, în special în dieta porcinelor, în anumite ţări, întrucât UE a interzis utilizarea ei ca antibiotic stimulator de creştere din 1999. Pristinamicina (1972) produsă de *S. pristinaespiralis* și derivații săi sunt

folosiți ca produse farmacoterapeutice pentru tratarea infecțiilor cauzate de bacterii multirezistente. **Etamicina** se află în curs de investigare, demonstrând potenţial terapeutic semnificativ. Descoperită în anul 1957, etamicina (viridogriseina) este o streptogramină de tip B produsă de *S. griseoviridis*, împreună cu **griseoviridina**, o streptogramină de tipA.

Streptograminele disponibile în practica clinică sunt semisintetice, reprezentate de combinaţia quinutupristină (derivată din pristinamicina IA, de tip B) / dalfopristină (derivată din pristinamicina IIA, de tip A), aprobată în anul 1999. Acest medicament a fost dezvoltat pentru îmbunătăţirea proprietăţilor fizico-chimice ale compusului medicamentos, întrucât streptograminele naturale sunt insolubile în apă.

Biosinteza streptograminelor. Structura chimică a streptograminelor, precum și organizarea genetică generală a biosintezei la tulpinile producătoare sunt foarte asemănătoare. Streptograminele de tip A sunt macrolactone polinesaturate, care sunt sintetizate de PKS și NRPS. Unitatea de pornire este izobutiril-CoA, provenită din valină, care este condensată cu şase unităţi de malonil-CoA și aminoacizii glicină, serină și prolină. Streptograminele de tip B sunt hexadepsipeptide ciclice ramificate, care sunt sintetizate de NRPS ce catalizează condensarea precursorilor. Cinci aminoacizi neproteinogeni (acid 3-hidroxipicolinic, acid D-aminobutiric, 4-N, N-dimetilamino-N-metil-L-fenilalanină, acid 4-oxo-L-pipecolic și L-fenilglicină) și doi aminoacizi proteinogeni (L-treonina și L-prolina) servesc drept precursori. Biosinteza streptograminelor debutează odată cu trecerea culturii de la metabolismul primar la cel secundar. Reglarea biosintezei streptograminei este extrem de complexă și s-a dovedit a fi influențată de condițiile fiziologice generale, disponibilitatea precursorilor, alimentarea cu oxigen, condițiile de pH şi prezenţa azotului.

Genele responsabile de biosinteza pristinamicinei la *S. pristinaespiralis* nu sunt organizate într-un singur cluster, ci sunt răspândite pe o porţiune de 210 kb, împreună cu genele pentru PKS. Dintre acestea au fost identificate gena receptorului γ-butirolactonă (*spbR*), două gene represoare pentru TetR (*papR3* și *papR5*), trei gene *SARP* (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*) (*papR1*, *papR2* și *papR4*) și o genă reglatoare de răspuns (*papR6*) (Mast şi colab. 2015).

Mecanismul de acţiune al streptograminelor. Fiecare din cele două antibiotice de tip streptogramină (tip A și tip B) prezintă o activitate bacteriostatică moderată, acţionând prin inhibarea sintezei proteinelor la procariote. Însă combinația ambelor antibiotice streptograminice conduce la o activitate sinergică puternică, care este de 100 de ori mai mare decât atunci când cele două componente acționează separat, ceea ce realizează activitatea bactericidă a amestecului de streptogramină.

Ținta ambilor compuşi este subunitatea 50S a ribosomului bacterian, unde compusul de tip A se leagă strâns în centrul catalitic al peptidil-transferazei, prin care este blocată atașarea ARNt la situsul acceptor și la situsul donator al enzimei. Astfel este blocată formarea legăturilor peptidice și este oprită alungirea lanțului de aminoacizi. Acest situs de legare și mecanism de inhibare este similar cu cel al cloramfenicolului. Interesant este că streptograminele de tip A prezintă o activitate bacteriostatică prelungită, care persistă chiar și după îndepărtarea substanței. În schimb, componentele de tip B nu afectează reacția peptidil-transferazei, ci inhibă procesul de alungire a peptidelor după câteva cicluri de formare a legăturii peptidice prin legarea la ARNr 23S în tunelul ribosomal de ieșire a peptidelor. Acest lucru este similar cu modul de acțiune al antibioticelor macrolide. Astfel, se previne extinderea lanțului proteic nascent și, în plus, complexul peptidil-

ARNt este eliberat din ribosom, ceea ce duce la peptide incomplete. Pe scurt, streptograminele de tip A inhibă faza incipientă a alungirii proteinelor, în timp ce streptograminele de tip B afectează faza târzie (Mast şi Wohlleben 2013).

Spectrul de acţiune al streptograminelor. Pristinamicina este foarte activă împotriva unei game largi de bacterii Gram-pozitive, inclusiv *S. aureus* rezistent la meticilină (MRSA) sau vancomicină (VRSA), tulpini de *Enterococcus faecium* rezistente la vancomicină (VRE) şi *Streptococcus pneumoniae* multirezistent, precum și împotriva câtorva bacterii Gram-negative, precum *Haemophilus influenzae* și *H. parainfluenzae*, dar și a altor agenți patogeni care provoacă pneumonie atipică, precum *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* şi *Legionella pneumophila* (Mast şi Wohlleben 2013). Etamicina are o activitate puternică împotriva mai multor agenți patogeni precum MRSA, *Streptococcus pyogenes* și *S. agalactiae*, *Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae*, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* şi *M. abscessus* (Hanh şi colab. 2020). Combinaţia de streptogramine semisintetice quinutupristină/dalfopristină este eficientă asupra germenilor multirezistenţi, mai puţin asupra unor tulpini de *Enterococcus faecalis* şi *E. faecium*. Totuşi, fenomenul de rezistenţă la aceste antibiotice nu a întârziat să apară, şi se manifestă prin trei mecanisme: modificarea ţintei antibioticului, prin mecanismul de rezistenţă încrucişată MLSB; inactivarea enzimatică a antibioticului; efluxul intensificat.

5.9. Pleuromutilinele

Pleuromutilinele sunt o clasă de antibiotice descoperite în anii 1950 prin izolarea **pleuromutilinei** naturale de la bazidiomicetele *Clitopilus scyphoides* f. *mutilus* (anterior *Pleurotus mutilis*) şi *Clitopilus passeckerianus* (anterior *P. passeckerianus*). Pleuromutilinele au o structură diterpenoidă ce constă într-un schelet triciclic denumit mutilină și un fragment de ester glicolic care formează lanțul lateral (**Figura 22**).

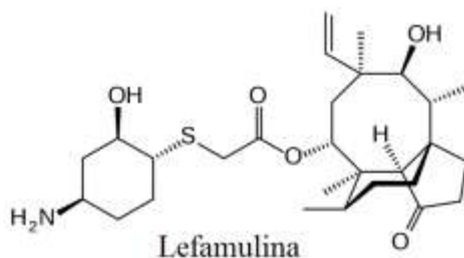


Figura 22. Structura lefamulinei.

Calea biosintezei pleuromutilinei, un metabolit secundar fungic, a fost caracterizată cu ajutorul tulpinilor mutante, prin inactivarea unor gene (*gene silencing* sau *gene knockout*), represia sau deleţia unei gene ţintă conducând la acumularea produşilor intermediari. De asemenea, clusterul de gene responsabile de biosinteza pleuromutilinei la *Clitopilus passeckerianus* a fost izolat şi exprimat heterolog în *Aspergillus oryzae*. S-a demonstrat că şapte gene (*Pl-ggs, Pl-cyc, Pl-p450-1, Pl-p450-2, Pl-sdr, Pl-atf* şi *Pl-p450-3*) sunt implicate în biosinteză, iar micromicetul *A. oryzae* poate fi utilizat ca platformă de bioconversie a analogilor de pleuromutilină, fiind capabil să genereze derivaţi semisintetici (Alberti şi colab. 2017).

Derivaţii semisintetici cu activitate antimicrobiană şi farmacologie îmbunătăţită au fost obţinuţi prin modificări ale moleculei la nivelul lanţului lateral. **Tiamulina** (1979) și **valnemulina** (1999) sunt utilizate în medicina veterinară pentru tratamentul infecțiilor pulmonare și intestinale, nefiind aplicaţi ca factori stimulatori de creştere în zootehnie.

Retapamulina este prima pleuromutilină aprobată pentru uz uman (2007), indicată pentru uz topic în tratamentul infecţiilor pielii. Este activă asupra stafilococilor, streptococilor şi a bacteriilor Gram-pozitive anaerobe. Lefamulina este un nou antibiotic semisintetic, aprobat în anul 2020, cu administrare sistemică la adulți diagnosticați cu pneumonie bacteriană comunitară cauzată de *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Legionella pneumophila, Haemophilus influenzae, Chlamydophila pneumoniae* şi *Mycoplasma pneumoniae*.

Mecanismul de acţiune al pleuromutilinelor şi fenomenul de rezistenţă PhLOPS. Pleuromutilinele inhibă sinteza proteinelor bacteriene prin legarea de subunitatea mare ribosomală la centrul peptidil transferazei, ceea ce împiedică poziționarea corectă a ARNt pentru transferul peptidelor în situsurile A și P, inhibând astfel formarea legăturii peptidice şi elongarea lanţurilor peptidice. Modalitatea de legare a moleculei lefamulinei prin intermediul a patru legături de hidrogen, stabilizată prin interacțiuni hidrofobe și Van der Waals, închide buzunarul de legare din cadrul ribosomului, îmbunătățind astfel eficacitatea terapeutică.

Se speră ca acest mecanism de acțiune, care diferă de cel al altor agenţi antimicrobieni capabili să inhibe sinteza proteinelor (macrolide, ketolide, lincosamide, streptogramine, oxazolidinone, fenicoli) să prevină apariţia şi propagarea fenomenului de rezistenţă antibacteriană şi rezistența încucişată cu alte clase de antibiotice. Din păcate, a fost descoperită o metiltransferază Cfr rar întâlnită, capabilă de metilarea ARNr 23S în poziţia A2503. Metilarea reprezintă un obstacol steric ce împiedică legarea fenicolilor, lincosamidelor, oxazolidinonelor, pleuromutilinelor și streptograminelor, ceea ce are ca rezultat fenotipul de rezistență PhLOPS. Gena *cfr* a fost identificată inițial la stafilococi coagulazo-negativi izolaţi de la animale şi mai recent de la om, iar ulterior în mai multe specii bacteriene, în special în tulpini de origine zoonotică. Gena *cfr* este localizată pe cromosom și pe diferite plasmide sau elemente transferabile, ceea ce indică riscul de răspândire prin transfer orizontal. Totuşi, rata de rezistenţă bacteriană la pleuromutiline rămâne scăzută (Paukner şi Riedl 2017).

5.10. Alte antibiotice obţinute prin biotehnologii

Pe lângă marile clase de antibiotice, o serie de compuşi antimicrobieni cu caracteristici distincte au fost obţinuţi biotehnologic. Ulterior, în producţie, sinteza chimică s-a dovedit a fi mai rentabilă. Unele substanţe se regăsesc pe lista medicamentelor esenţiale a WHO.

Bacitracina constituie un amestec de peptide ciclice înrudite, izolat pentru prima dată în anul 1945. Alcătuită din 11 tipuri de aminoacizi, este produsă de *Bacillus subtilis* şi *B. licheniformis*. Biosinteza bacitracinei la *B. licheniformis* este catalizată de NRPS codificate de patru gene: *bacT, bacA, bacB* şi *back*. Compusul inhibă sinteza peretelui celular la bacterii Gram-pozitive și câteva specii de bacterii Gram-negative. Fiind nefrotoxic, este inclus în unguente cu aplicare locală, pentru prevenirea infecţiilor. Are utilizări şi în medicina veterinară, ca aditiv furajer, unde

legislaţia permite. Bacitracina are aplicaţii şi în testele de laborator, fiind utilizată pentru identificarea unor specii de bacterii intrinsec rezistente la bacitracină, precum *Haemophylus influenzae*. În schimb, *Streptococcus pyogenes* este susceptibil la bacitracină, spre deosebire de alţi streptococi cu rezistenţă intrinsecă.

Cloramfenicolul este primul amfenicol descoperit, introdus în practica clinică în anul 1949. Are o structură de tip fenil-propanoid (**Figura 23**), ca şi alte antibiotice din acest grup: tiamfenicolul, floramfenicolul şi azidamfenicolul. Cloramfenicolul a fost descoperit ca produs al metabolismului secundar la *Streptomyces venezuelae,* ulterior compusul sintetizat chimic a înlocuit preparatul obţinut pe cale biotehnologică. Calea biosintezei cloramfenicolului la *S. venezuelae* este codificată în clusterul de gene *sven* (Fernández-Martínez şi colab. 2014). Mecanismul de acţiune presupune legarea de subunitatea mare ribosomală, inhibând reversibil formarea legăturilor peptidice de către peptidil-transferază. Mecanismul diferă de cel al macrolidelor prin faptul că acestea din urmă se leagă steric, în timp ce cloramfenicolul se leagă specific de ARNr 23S în anumite poziţii. Cloramfenicolul poate acţiona asupra ribosomilor mitocondriilor şi poate avea efect mutagen. Efectele adverse au condus la etichetarea cloramfenicolului cu avertisment pentru riscul de anemie aplastică, mielosupresie şi sindromul gri neonatal.

Este un agent bacteriostatic cu spectru larg, acţionând asupra bacteriilor aerobe şi anaerobe, Gram-pozitive şi Gram-negative. Cloramfenicolul a fost utilizat pentru prima dată pentru tratamentul febrei tifoide, dar răspândirea rezistenţei agentului *Salmonella typhi* a dus la pierderea valorii sale clinice. Este utilizat pe scară largă pentru tratamentul conjunctivitei bacteriene, a abceselor cerebrale stafilococice și a meningitei. Este utilizat pentru tratarea infecțiilor cauzate de *Vibrio cholerae* rezistent la tetraciclină și a VRE. Rezistenţa microbiană este conferită de gena *cat,* care codifică enzima cloramfenicol acetiltransferază, ce inactivează cloramfenicolul. Permeabilitatea redusă a membranei și mutația subunității ribosomale 50S sunt alte mecanisme microbiene care ajută bacteriile să reziste efectului acestui vechi antibiotic.

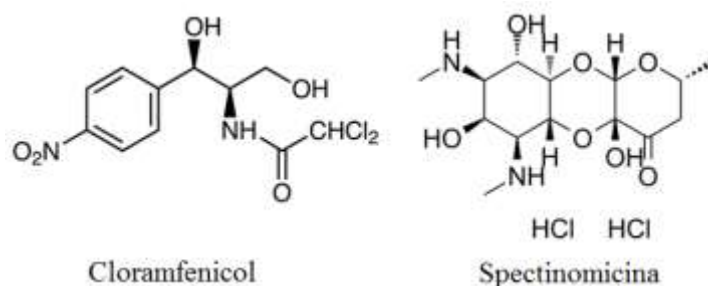


Figura 23. Structura cloramfenicolului şi a spectinomicinei.

Spectinomicina (1961) este un compus asemănător aminoglicozidelor, care face parte din grupa aminociclitolilor, constând dintr-un sistem triciclic în care actinamina şi aminospectoza sunt fuzionate la un inel dioxan (**Figura 23**). Asemenea streptomicinei, cele două subunităţi ale moleculei sunt derivate din D-glucoză şi mioinozitol. Spectinomicina este produsă industrial prin fermentaţie cu ajutorul unor tulpini de *Streptomyces* sp., pe medii complexe cu glucoză şi bogat oxigenate. Clusterul de gene responsabil de biosinteza spectinomicinei la *Streptomyces spectabilis* conţine 15 ORF ce codifică o suită de gene *spc* codificând enzimele necesare (Thapa şi colab. 2008). Rezistenţa la spectinomicină este realizată prin intermediul unor adeniltransferaze capabile să inactiveze antibioticul, codificate de gene *spc*, *spd* şi *spw* (Jamrozy şi colab. 2014).

Acţionează inhibând sinteza proteinelor prin blocarea sterică a subunităţii mici ribosomale, şi astfel a translocării şi transferului ARNm şi ARNt în ribosom. Spectinomicina este un antibiotic cu spectru larg, cu activitate moderată împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. De un interes deosebit este activitatea sa împotriva *Neisseria gonorrhoeae,* inclusiv în cazul tulpinilor producătoare de beta-lactamază. Alţi germeni responsabili de boli cu transmitere sexuală, precum *Chlamydia trachomatis* şi *Treponema pallidum*, sunt rezistenţi la spectinomicină.

Fosfomicina este singurul antibiotic din grupul fosfonaţilor, disponibil din anul 1973. Se cunosc doar aproximativ 40 de molecule naturale care deţin legătura C-P, și multe dintre ele prezintă activități biologice interesante. Fosfomicina este un acid fosfonic natural care conține un inel epoxid tensionat structural (**Figura 24**) și astfel reactiv din punct de vedere chimic, proprietate ce conferă o bună activitate antibacteriană aceastei molecule cu greutate moleculară mică. Structural, imită fosfoenolpiruvatul, o sursă importantă de energie pentru celula bacteriană. Compusul farmaceutic a fost descoperit ca fiind produs de *Streptomyces fradiae*, dar este obţinut industrial prin sintetiză chimică. Biosinteza fosfomicinei la *Streptomyces* sp. este codificată în clusterul de gene *fom* şi se desfăşoară în şapte etape, pornind de la piruvat. Unele tulpini de *Pseudomonas* sp. pot sintetiza fosfomicina printr-o cale biosintetică ce diferă de cea de la streptomicete (Cao şi colab. 2019).

Fosfomicina are activitate bactericidă, inhibând în mod eficient etapa inițială în biogeneza peptidoglicanului prin blocarea ireversibilă a enzimei MurA, ce catalizează legarea fosfoenolpiruvatului la N-acetil glucozamină. Mecanismele de rezistenţă includ penetrarea redusă în celulă, modificări ale ţintei MurA, supraexprimarea ţintei sau modificarea antibioticului de către metaloenzime ce inactivează fosfomicina (codificate de genele *fos*).

Are un spectru larg de acţiune, împotriva unei varietăți de bacterii Gram-negative și Gram-pozitive, inclusiv izolate clinice şi multirezistente de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Salmonella schottmuelleri, Serratia marcescens, Salmonella typhi, Citrobacter* sp., *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* (inclusiv MRSA), *Staphylococcus epidermidis* și *Streptococcus pyogenes*. *Pseudomonas aeruginosa* prezintă o susceptibilitate moderată, eficacitatea fosfomicinei fiind îmbunătățită în combinație cu alte antibiotice precum cefalosporine, carbapeneme, aminoglicozide etc. Tulpini rezistente la fosfomicină au fost identificate la speciile *Acinetobacter baumannii, Vibrio fischeri, Chlamydia trachomatis* și *Bacteroides* sp.

Deoarece fosfomicina are un mecanism de acțiune inedit, toxicitate scăzută, un spectru larg de activitate antibacteriană, proprietăți farmacodinamice / farmacocinetice excelente și o bună biodisponibilitate, a fost aprobată pentru utilizare clinică în tratamentul infecțiilor bacteriene ale tractului urinar în multe ţări timp de câteva decenii. În plus, utilizarea sa potențială pentru infecții bacteriene dificil de tratat a devenit promițătoare, iar fosfomicina a devenit un candidat ideal pentru tratamentul eficient al infecțiilor cauzate de bacterii multirezistente, în special în combinație cu alte farmacoterapeutice (Cao şi colab. 2019).

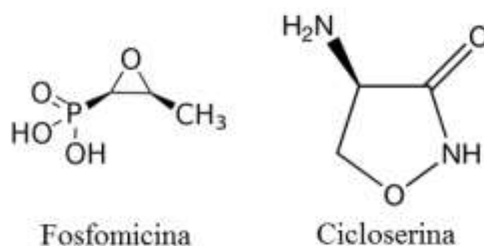


Figura 24. Structura fosfomicinei şi a cicloserinei.

Cicloserina este un antibiotic heterociclic, analog ciclic al aminoacidului D-alanină, introdusă în terapie în anul 1964. Produsă de *Streptomyces orchidaceous, S. garyphalus* şi *S. lavendulae*, poate fi obţinută prin bioconversie enzimatică pornind de la serină. Clusterul de gene *dcs* la *S. lavendulae* este organizat în 10 ORF, într-un fragment de 21 kb, fiind implicat în biosinteza cicloserinei pornind de la L-serină şi L-arginină (Kumagai şi colab. 2010).

D-cicloserina este o 4-amino-1,2-oxazolidin-3-onă (**Figura 24**), deci tehnic o oxazolidinonă, însă mecanismul de acţiune este diferit de cel al acestei clase de antibiotice. Fiind un analog al D-alaniei, cicloserina inhibă sinteza peretelui celular bacterian prin interferenţa cu două enzime: L-alanin-racemaza (care formează D-alanină din L-alanină) și D-alanin- D-alanin-ligaza (care încorporează D-alanină în pentapeptida necesară formării peptidoglicanului). Este utilizată în regim polifarmacoterapic în tratamentul tuberculozei, atunci când s-a dezvoltat rezistență sau toxicitate la medicamentele de primă linie. Are rol de agent antituberculos, agent antiinfecțios, antimetabolit, metabolit și agonist al receptorilor N-metilaspartatului, un neurotransmiţător.

Colistina (polimixina E) este prima polimixină introdusă în terapie (1958), fiind şi în prezent produsă industrial cu ajutorul bacteriei *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus*. Ulterior (1964) a fost dezvoltat şi un derivat semisintetic numit polimixina B. Polimixinele sunt decapeptide ciclice non-ribosomale, cu o moleculă policationică amfifilă ce conţine atât grupări hidrofile cât şi lipofile (**Figura 25**). Biosinteza colistinei porneşte de la trei amionoacizi (treonină, leucină şi acid diaminobutiric), fiind realizată de trei NRPS modulare codificate de gene *pmx* grupate într-un cluster de 41 kb (Tambadou şi colab. 2015).

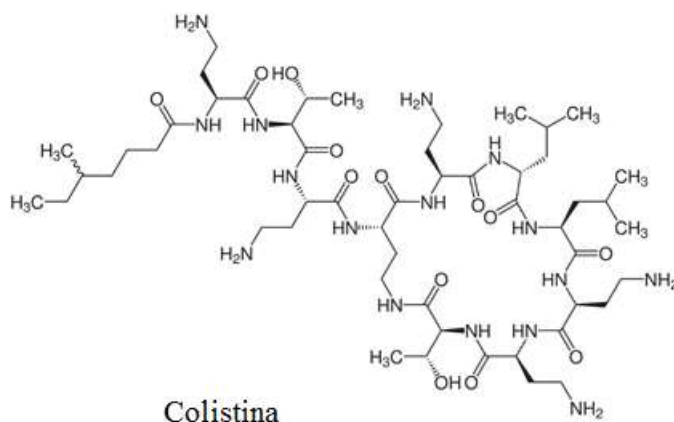


Figura 25. Structura colistinei.

Regiunile cationice interacționează electrostatic cu membrana externă a bacteriilor Gram-negative, înlocuind cationii bivalenţi de Ca^{2+} şi Mg^{2+} din grupările fosfat ale lipopolizaharidelor membranare. Afinitatea colistinei pentru lipopolizaharidele membranare este de cel puţin trei ori mai mare decât pentru cationii bivalenţi. Aceste proprietăţi îi permit să acţioneze similar unui

detergent, permeabilizând membrana. Regiunile hidrofobe ale moleculei pătrund în interiorul celulei unde acţionează la disrupţia membranei şi liza celulei, realizând efectul bactericid. În plus, colistina inhibă endotoxinele bacteriene, perturbă veziculele celulare, produce specii reactive de oxigen şi inhibă enzimele respiraţiei celulare (Ahmed şi colab. 2020). Aceste mecanisme suplimentare permit colistinei să fie eficientă şi asupra bacteriilor Gram-pozitive.

Colistina este activă împotriva agenților patogeni Gram-negativi aerobi precum *P. aeruginosa* rezistentă la carbapeneme, *A. baumannii, K. pneumoniae, E. coli* și alte *Enterobacteriaceae*. Polimixina B prezintă un spectru larg de activitate, în special împotriva bacteriilor Gram-negative, dar este eficientă și împotriva bacteriilor Gram-pozitive *Staphylococcus aureus, Streptococcus gordonii, S. agalactiae*, precum și împotriva bacteriilor facultativ anaerobe cum este *Listeria monocytogenes*.

Unele bacterii posedă rezistență intrinsecă la colistină: *Serratia marcescens, Proteus* sp., *Providencia* sp., *Morganella morganii, Vibrio cholerae, Burkholderia cepacia, Brucella* sp., *Campylobacter* sp., *Legionella* sp., *Chromobacterium* sp., *Neisseria* sp., *Edwardsiella* sp., unele specii de *Aeromonas* şi coci Gram-negativi anaerobi. Mecanismele de rezistență la polimixine sunt complexe şi includ: (i) modificări ale lipopolizaharidelor prin adăugarea de grupări cationice; (ii) mutații care duc la pierderea lipopolizaharidelor; (iii) mutații ale porinei și supraexprimarea pompelor de eflux; (iv) superproducție de polizaharide capsulare care ascund situsurile de legare a polimixinei; (v) inactivarea enzimatică a colistinei.

Din cauza efectelor adverse (nefrotoxicitate şi neurotoxicitate), polimixinele au fost abandonate în anii 1970, când au fost de altfel descoperite foarte multe alte antibiotice. Au continuat să fie administrate în infecţii cu pseudomonade pacienţilor cu fibroză chistică şi în infecţii oculare şi auriculare. În prezent sunt reevaluate pentru revitalizarea lor ca agenţi eficienţi pentru combaterea patogenilor multirezistenţi (Ahmed şi colab. 2020). Din anul 2015, în UE, utilizarea polimixinei B este limitată aplicării locale pentru infecţii ale pielii.

Daptomicina este o lipopeptidă acidă naturală produsă de *Streptomyces roseosporus*, disponibilă în terapie din anul 2003. Se obţine din cultură suplimentată cu acid decanoic. Molecula complexă a daptomicinei este formată din 13 aminoacizi, dintre care 10 sunt dispuși într-un ciclu macrolactonic şi trei lateral (**Figura 26**). Conţine doi aminoacizi neproteinogeni deosebiţi, acidul 3-metilglutamic şi L-kinurenina, ce apare doar în molecula de daptomicină.

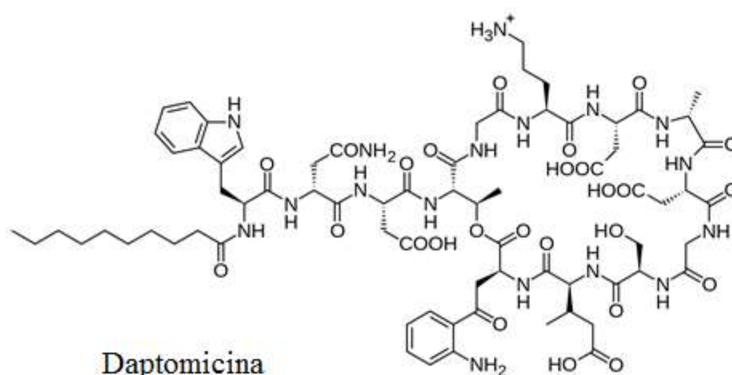


Figura 26. Structura daptomicinei.

Clusterul de gene responsabile de biosinteza daptomicinei la *S. roseosporus* implică trei gene *dpt* parţial suprapuse ce codifică trei NRPS multimodulare, dar şi alte gene *dpt* responsabile de modificările ulterioare. Biosinteza este inițiată prin cuplarea acidului decanoic la reziduul de triptofan N-terminal, urmată de cuplarea celorlalţi aminoacizi prin mecanisme catalizate de NRPS ce realizează o suită de activităţi tipice de condensare, adenilare şi tiolare. În cele din urmă, are loc ciclizarea lanţului, catalizată de o tioesterază, urmând eliberarea lipopeptidei. Acidul decanoic din molecula daptomicinei este sintetizat pe calea acizilor graşi.

Daptomicina are un mecanism de acțiune distinct, perturbând mai multe funcții ale membranei celulare bacteriene. Pătrunde prin membrana celulară într-un mod dependent de calciu sau de fosfatidil glicerol, apoi moleculele lipopeptidice ale antibioticului se agregă modificând curbura membranei, creează pori şi determină ieşirea ionilor din celulă. De asemenea, induce depolarizarea rapidă şi pierderea potențialului membranei, ceea ce duce la perturbarea metabolismului şi implicit la moartea celulelor bacteriene.

Este administrată în infecţii sistemice cauzate de bacterii Gram-pozitive precum MRSA şi VRE, pentru tratamentul infecțiilor pielii și a structurilor pielii și pentru tratamentul bacteriemiei și endocarditei cauzate de tulpini rezistente la antibiotice. O mare îngrijorare o reprezintă observarea fenomenului de rezistenţă la daptomicină a stafilococilor şi a enterococilor. Modificarea ţintei antibioticului implică o serie de gene ce controlează răspunsul la stres al membranei celulare ori metabolismul fosfolipidic (Miller şi colab. 2016).

O altă lipopeptidă naturală, **friulimicina** produsă de *Actinoplanes friuliensis* este în curs de investigare. Clusterul de gene implicate în biosinteză a fost caracterizat, fiecare grup de gene nou analizat reprezentând un nou instrument pentru biosinteza combinatorie, oferind informații despre sinteza unor grupări neobișnuite, cum ar fi aminoacizii neproteinogeni, reziduurile acil și porțiunile glucidice (Müller şi colab. 2007). Manipularea programată a genelor care codifică enzimele în căile biosintetice oferă perspective pentru reproiectarea acestor compuşi pentru a crea antibiotice cu noi activități noi și capacitatea de a depăși rezistența bacteriană.

Rifampicina este un polichetid ce face parte din grupul ansamicinelor (**Figura 27**), derivat din rifamicina SV produsă de *Amycolatopsis rifamycinica* (iniţial identificată ca *Streptomyces mediterranei*, apoi redenumită *Nocardia mediterranei* şi *Amycolatopsis mediterranei*). În mod natural, bacteria produce rifamicina B, un compus cu activitate antimicrobiană modestă. Produsul disponibil comercial încă din anul 1967 conţine rifamicină SV, obţinută prin bioconversie enzimatică sau prin blocarea ultimei etape de biosinteză la tulpini mutante, rifamicina SV fiind un precursor al biosintezei rifamicinei B. Biosinteza polichetidului are loc prin asamblarea moleculei pornind de la o grupare aromatică (acidul 3-amino-5-hidroxibenzoic, care se formează din kanozamina derivată din glucoză) extinsă cu două molecule de acetat şi opt de propionat pe o cale hibridă PKS/NRPS. În clusterul de gene responsabile de biosinteza rifamicinei (*rif*), 5 ORF mari codifică o PKS de tip I cu 10 module şi NRPS responsabile de adenilarea, tiolarea, eliberarea şi ciclizarea undecachetidului într-o moleculă macrolactam, proansamicina (Floss şi Yu 2005). Ulterior aceasta suferă câteva modificări catalizate enzimatic (acetilare, metilare etc), rezultând rifamicina B (Xu şi colab. 2005).

Rifampicina manifestă acţiune antimicrobiană prin inhibarea sintezei ARN, mai exact a ARN polimerazei dependente de ADN. Prin legarea în afara situsului activ al enzimei, blochează

steric elongarea şi scade afinitatea ARN polimerazei pentru transcripturi scurte de ARN. Inhibă în mod specific ARN polimeraza la procariote și nu acționează asupra enzimei la mamifere.

Rifampicina prezintă un spectru larg de acţiune, mai ales asupra bacteriilor Gram-pozitive şi în special asupra micobacteriilor. Este utilizată ca tratament de linia adoua în tuberculoză, lepră, infecţii cu *Legionella pneumophila* sau complexul *Mycobacterium avium*. Întrucât rezistenţa la rifampicină apare tot mai des, medicamentul este asociat în scheme polifarmacoterapice. Rezistenţa la rifamipicină, de care sunt responsabile diferite gene *rpo*, se datorează modificării situsului de legare (ARN polimeraza) şi efluxului intensificat. Alţi derivaţi semisintetici ai rifamicinelor (rifabutina) sunt activi asupra patogenilor rezistenţi la rifampicină (Floss şi Yu 2005).

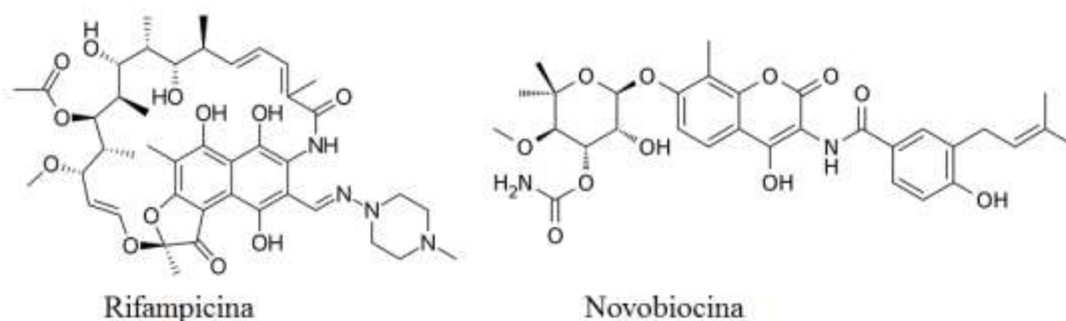


Figura 27. Structura rifampicinei şi a novobiocinei.

Novobiocina (1960) este o aminocumarină produsă de tulpini de *Streptomyces niveus* (anterior *S. spheroides*) Structural, molecula este compusă din trei unităţi structurale: un zahar denumit novioză, o cumarină și un acid 4-hidroxibenzoic prenilat (**Figura 27**). Biosinteza celor trei unităţi se realizează independent, pornind de la glucoză, tirozină şi respectiv prefenat, urmând conectarea celor trei inele prin legături glicozidice și amidice. Clusterul de gene responsabil de biosinteza novobiocinei indică un set de 23 gene *niv* ce au fost adnotate ca fiind implicate în diverse etape, împreună cu gena $gyrB^r$ ce conferă autorezistenţă (Steffensky şi colab. 2000).

Mecanismul de acţiune al novobiocinei se bazează în principal pe inhibarea subunității GyrB a ADN girazei, o topoizomerază tip II ATP-dependentă. Novobiocina se leagă de giraza bacteriană, inhibând competitiv ATPaza. De asemenea inhibă activitatea ATPazei topoizomerazei IV bacteriene, care aparține aceleiași familii de topoizomeraze II, ca şi giraza (Oblak şi colab. 2007).

Datorită activității sale antibacteriene excelente împotriva agenților patogeni Gram-pozitivi, novobiocina a fost utilizată pentru tratamentul infecțiilor cu MRSA, dar în prezent în UE este rezervată pentru uz veterinar, împotriva mastitei la bovine. Câţiva derivați de novobiocină au fost dezvoltaţi şi sunt investigaţi cu scopul de a îmbunătăți proprietățile fizico-chimice și de a spori eficiența şi siguranţa.

De asemenea, analogi ai novobiocinei sunt testaţi pentru proprietăţi potenţial anticancerigene. Recent s-a constatat că novobiocina acționează și asupra celulelor eucariote prin blocarea proteinei de șoc termic Hsp90, o chaperonă critică pentru plierea, stabilizarea și activarea multor proteine, în special a oncoproteinelor responsabile de progresia cancerului (Dlugosz şi Janecka 2017).

5.11. Antibiotice obţinute prin sinteză chimică

Câteva clase de antibiotice de sinteză includ compuşi cu valoare apreciabilă, care sunt frecvent utilizaţi pentru terapia bolilor infecţioase. Astfel de antibiotice consacrate sunt sulfonamidele, chinolonele şi oxazolidinonele **(Figura 28)**.

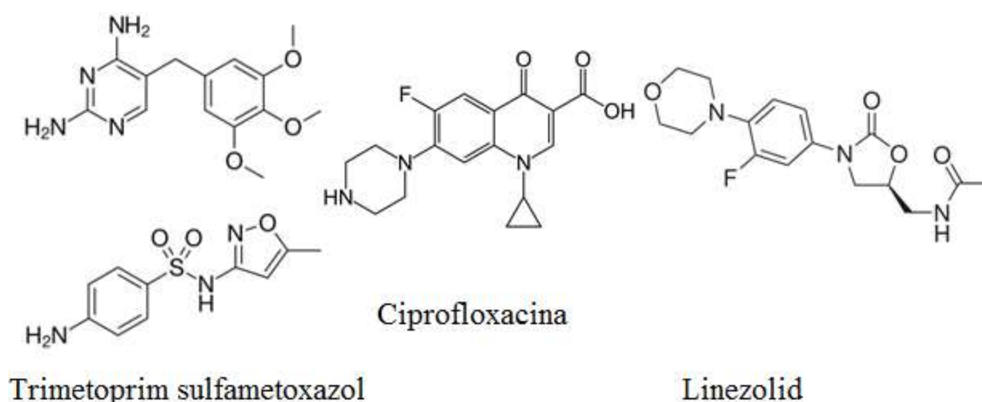


Figura 28. Structura principalelor antibiotice obţinute prin sinteză chimică.

Sulfonamidele constituie primul grup de antibiotice descoperit şi introdus în practică în anii 1930. Au efect bacteriostatic, interferând procesul de sinteză a acidului folic, un metabolit esenţial. Acţionează ca inhibitori competitivi ai dihidropteroat sintetazei, enzima responsabilă de înglobarea acidului paraaminobenzoic pentru formarea moleculei de acid folic. Sunt antibiotice cu spectru larg, ce include atât bacterii Gram-pozitive cât şi Gram-negative, protozoare intracelulare precum *Toxoplasma* sp. etc. Încă este des utilizată substanţa activă sulfametoxazol, care, în combinaţie cu trimetoprim, acţionează sinergic având efect bactericid.

Chinolonele constituie o clasă importantă de agenţi antimicrobieni, chinolonele fiind descoperite accidental în anii 1960, ca produşi secundari rezultaţi în sinteza clorochinei. Chinolonele de primă generaţie (acidul nalidixic) au fost introduse în practică începând cu anul 1967. Cele de generaţia a doua, denumite florochinolone (ciprofloxacina, norfloxacina), au fost lansate începând cu anii 1980, iar cele de generaţia a treia (levofloxacina) în anii 1990. Au efect bactericid, interferează cu replicarea ADN inhibând activitatea de ligare a topoizomerazelor de tip II, ADN girazei şi topoizomerazei tip IV. Sunt antibiotice cu spectru larg, prescrise pentru o gamă variată de infecţii urinare, ginecologice, osoase, articulare, ale tractului respirator, sinuzite, gastroenterite etc. fiind printre cele mai utilizate antibiotice. Florochinolonele interacționează cu diferiți receptori ai celulei eucariote, ceea ce se concretizează în efecte adverse la nivelul tendoanelor, muschilor şi sistemului nervos.

Oxazolidinonele au intrat în practica clinică în anul 2000, fiind antibiotice rezervate infecţiilor grave cu bacterii Gram-pozitive aerobe multirezistente. Inhibă sinteza proteinelor bacteriene în etapa iniţierii acesteia, blocând legarea complexului N-formilmetionil-ARNt la ribosom. Mecanismul unic poate preveni rezistenţa încrucişată cu alte antibiotice ce inhibă sinteza proteinelor (cloramfenicol, lincomicină etc). Două oxazolidinone sunt disponibile comercial: linezolidul recomandat pentru infecţii sistemice şi tedizolidul pentru infecţii ale pielii.

5.12. Rezistenţa bacteriană la acţiunea antibioticelor

Rezistența la antibiotice reprezintă capacitatea naturală sau dobândită a unui microorganism de a fi imun la efectele unuia sau mai multor antibiotice. Deși această noțiune este folosită și referitor la rezistența naturală (capacitatea intrinsecă a unor bacterii de a rezista la acţiunea anumitor agenţi antimicrobieni), de o mai mare importanță clinică și științifică este rezistența dobândită. Rezistența la antibiotice poate să apară prin selecție naturală sau prin mutații (sub efectul factorilor de mediu mutageni sau prin erori necorectate în procesul de replicare a ADN). Odată apărută rezistența la antibiotice, gena codificând acest caracter se poate răspândi la alte celule prin transfer lateral de gene (*horizontal gene transfer*, HGT). O bacterie poate purta simultan mai multe gene de rezistență la antibiotice. Dacă este rezistentă la cel puţin trei clase distincte de antibiotice, este denumită multirezistentă.

Rezistenţa bacteriană la antibiotice şi dezinfectanţi a apărut odată cu utilizarea la scară largă a antibioticelor şi a biocidelor (**Figura 29**). Caracterizarea bacteriilor din era pre-antibiotică, păstrate din anii 1914-1950 în aşa-numita colecţie Murray arată că în acea perioadă microorganismele erau susceptibile acţiunii oricărui agent antibiotic. Deşi sulfonamidele au fost introduse în practica clinică la mijlocul anilor 1930, colecţia Murray este susceptibilă acestei clase de substanţe antibacteriene sintetice. Totuşi, multe dintre aceste tulpini conţin plasmide, fiind capabile de a iniţia transferul genetic prin conjugare.

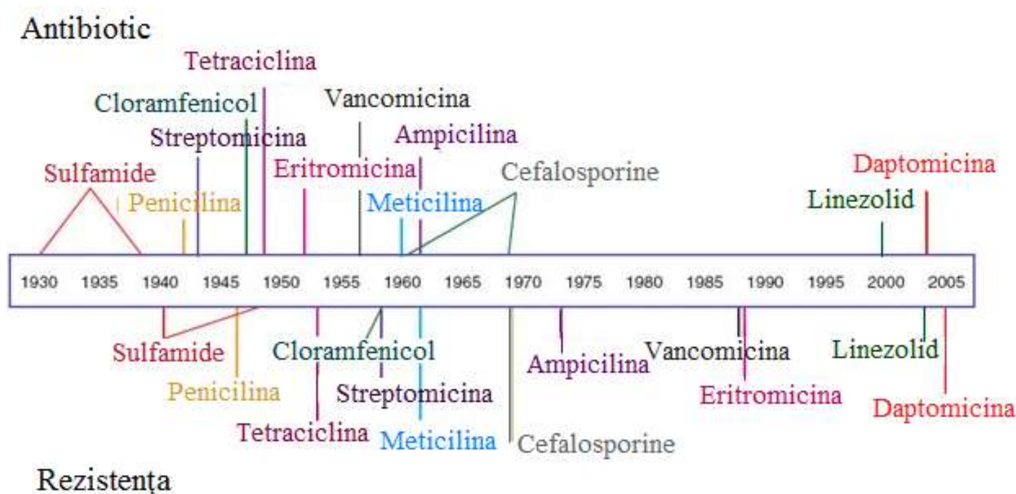


Figura 29. Implementarea antibioticelor în terapie şi apariţia fenomenului de rezistenţă (după Clatworthy şi colab. 2007).

Cu toate că prezenţa genelor de rezistenţă a fost iniţial observată şi studiată în cazul tulpinilor bacteriene patogene izolate din mediul clinic, ulterior s-a observat că elementele genetice determinante sunt răspândite dinamic într-un spectru larg de specii din mediul ambiant. HGT se realizează prin intermediul unor elemente genetice mobile cum sunt plasmidele, transposonii, integronii mobili sau insulele genetice. Era antibiotică coincide cu momentul apariţiei în diverse medii a integronilor ce poartă multiple casete de gene. Integronii reprezintă o familie complexă de

elemente genetice mobile, capabile de achiziţia şi exprimarea genelor ce conferă rezistenţa la antibiotice şi biocide. Peste 100 de clase distincte de integroni au fost caracterizate până acum, estimându-se că aproximativ 10% din genomurile bacteriene deţin aceşti vectori de transfer.

Datele recente privind răspândirea fenomenului de rezistenţă sunt îngrijorătoare. Astfel, WHO recomandă un sistem global de monitorizare a răspândirii microbilor rezistenți, avertizând asupra riscului intrării omenirii în era post-antibiotică: „O eră post-antibiotică - în care infecții comune și leziuni minore pot ucide - departe de a fi o fantezie apocaliptică, este o posibilitate foarte reală pentru secolul XXI" (Keiji Fukuda, WHO, asistent director general pentru securitatea sanitară, Aprilie 2014, http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135).

Rezistența la antibiotice poate fi indusă unui microorganism și pe cale artificală, prin tehnici de transformare genetică. Această metodă este utilă în inginerie genetică și în biotehnologie pentru selectarea bacteriilor care poartă un anumit caracter adițional, transmis împreună cu gena de rezistență.

Există mai multe mecanisme prin care se manifestă fenomenul de resistenţă:

1. Inactivarea sau distrugerea antibioticului - de exemplu inactivarea penicilinei prin producerea unor enzime (beta-lactamaze) care rup legătura beta-lactamică din molecula acesteia. De asemenea, modificări enzimatice ale antibioticelor (aminoglicozide, macrolide, tetracicline) prin fosforilare, acetilare, adenilare, glicozilare sau hidroxilare previn legarea acestora de ţintă;

2. Modificarea țintei (locului de legare a antibioticului) asftel încât molecula antibioticului să nu mai poată reacționa cu componentele celulare - de exemplu ribosomi (rezistenţa MLSB) sau enzime implicate în sinteza peretelui bacterian (rezistenţa la vancomicină);

3. Modificarea căilor metabolice la nivelul cărora acționează antibioticele - cazul unor bacterii rezistente la sulfonamide, care în loc să sintetizeze acidul folic pornind de la acid para-aminobenzoic, folosesc acid folic preformat, la fel ca celulele mamiferelor;

4. Inhibarea pătrunderii antibioticului în celulă - de exemplu mecanismul de rezistență la macrolide;

5. Eliminarea antibioticului (efluxul activ) - observat la unele specii în cazul aminoglicozidelor, macrolidelor etc;

6. Supraexprimarea ţintei moleculare (observată *in vitro*) şi protecţia ţintei medicamentului, spre exemplu în cazul unor gene de rezistenţă la tetracicline (Wilson 2014).

Strategiile de combatere a acestor mecanisme de rezistenţă includ:

- Profilaxia prin vaccinare în locul tratării infecţiilor cu antibiotice;
- Scheme de tratamente polifarmacoterapice şi rotaţia alternativă a două-trei antibiotice;
- Intensificarea eforturilor pentru descoperirea şi dezvoltarea de noi antibiotice;
- Revitalizarea unor medicamente vechi, mai mult sau mai puţin scoase din terapie de cele noi;
- Diagnosticarea rapidă şi efectuarea antibiogramei înainte de a fi indicat tratamentul;
- Metode alternative precum terapia cu bacteriofagi.

Mecanismele genetice de rezistenţă bacteriană la antibiotice sunt foarte numeroase, în prezent fiind cunoscute aproape 3.000 de gene de rezistenţă. Multe au fost identificate atât în tulpini clinice (Farkas şi colab. 2017; 2019) cât şi în cele izolate din mediul înconjurător, în special din medii intens antropizate (efluenţi din spitale, staţii de epurare a apelor uzate, ferme zootehnice etc)

(Szekeres şi colab. 2017; Butiuc-Keul şi colab. 2021). Câteva din cele mai reprezentative şi răspândite tipuri de gene de rezistenţă, grupate după cele mai importante clase de antibiotice:

I. Rezistenţa la antibioticele beta-lactamice. O caracteristică comună a bacteriilor Gram-negative o reprezintă capacitatea de degradare a inelului β-lactam, având ca rezultat inactivarea moleculelor antibioticului. Este un mecanism ce presupune enzime multiple, care se diseminează prin elemente genetice mobile în agenţi patogeni oportunişti (*Enterobacteriaceae*), dar și în germeni nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa*). Astfel de enzime sunt:

- Beta-lactamazele grupate la rândul lor în patru clase: beta-lactamazele serine la locul activ (clasele A, C și D) și zinc-dependente sau metalo-beta-lactamaze (MBL, clasa B). Se disting mai multe grupuri:

- Grup 1: cefalosporinaze neinhibate de acidul clavulanic;
- Grup 2: penicilinaze şi cefalosporinaze inhibate de acidul clavulanic;
- Grup 3: metaloenzime: bla_{IPM}, bla_{VIM};
- Beta-lactamaze cu spectru larg (*extended spectrum betalactamases*, ESBLs): *blaTEM*, bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{OXA}, bla_{NDM};

- Carbapanemazele sunt mai nou apărute, iar diseminarea lor reprezintă o mare îngrijorare globală: bla_{VIM}, bla_{OXA}, bla_{IMP}, bla_{KPC}, bla_{NDM} (Tooke şi colab. 2019).

II. Rezistenţa la aminoglicozide poate fi generată prin câteva mecanisme:

- Inactivarea aminoglicozidelor prin modificare enzimatică realizată de acetiltransferaze, nucleotidiltransferaze sau fosfotransferaze, modalităţi observate frecvent la bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative. Se cunosc peste 100 de enzime capabile să modifice structural antibioticele aminoglicozidice (Ramirez şi Tolmasky 2010):

- N-acetiltransferaze (*aac*)
- O-adenililtransferaze (*ant*)
- O-fosfotransferaze (*aph*)

- Eflux intensificat;
- Permeabilitate scăzută;
- Modificări ale subunității ribosomale 30S care interferează cu legarea aminoglicozidelor, prin mutaţii punctiforme şi modificări post-transcripţionale (Doi şi colab. 2016) sau metilarea ARNr 16S (Krause şi colab. 2016).

III. Rezistenţa la glicopeptide. Rezistenţa la vancomicină şi teicoplanină a fost observată în cazul speciilor de *Enterococcus* şi a *S. aureus*, fiind codificată de gene multiple situate în operoni *Van*. Acestea acţionează modificând ţinta antibioticului prin reprogramarea peptidoglicanului (*vanA*, *vanC*) sau eliminând ţinta pentru glicopeptide (*vanX*, *vanY*) (Lebreton şi Cattoir 2019).

IV. Rezistenţa la macrolide, lincosamide şi streptogramine poate fi realizată prin:

- Modificarea ţintei medicamentului prin metilare sau mutaţii, previne legarea antibioticului la ţintă, de exemplu metilarea ribosomală (*erm*);
- Eflux intensificat (*msr, mef, lsa, vga*);
- Degradarea antibioticului (*ere, inu, mph, vgb*) (Leclercq 2002).

V. Rezistenţa la fenicoli, lincosamide, oxazolidinone, pleuromutiline și streptogramine (fenotipul PhLOPS) este datorată:

- Modificării ţintei medicamentului prin metilare ribosomală (*cfr*).

VI. Rezistenţa la tetracicline este mediată prin cel puţin patru căi:

- Mutaţii la nivelul situsului de legare al antibioticului (în gena ARNr 16S sau în gena *rpsJ*);
- Protecţie ribosomală: *tet(O), tet(M)*;
- Pompe de eflux pentru tetracicline: *tet(A), tet(B), tet(K), tet(L)*;
- Inactivarea enzimatică a antibioticului: *tet(X)* (Grossman 2016).

VII. Rezistenţa la sulfonamide. Rezistența bacteriană la sulfonamide apare în principal din cauza mutațiilor genei *folP* care codifică dihidropteroat sintaza (DHPS) implicată în biosinteza nucleotidelor sau prin achiziționarea de gene DHPS alternative (*sul1, sul2, sul3*), ale căror produse au o afinitate scăzută la sulfonamide. Recent a fost raportată o nouă genă din aceeaşi familie (*sul4*), precum şi un nou mecanism de rezistenţă bazat pe degradarea sulfonamidelor (Razavi şi colab. 2017; Kim şi colab. 2019).

VIII. Rezistenţa la biocide. Este codificată în casete de gene responsabile de activitatea pompelor de eflux pentru compuşi cuaternari cu amoniu, cum sunt cloraminele (*qacA/B, qacC, qacE, qacF, qacG, qacH* şi *qacJ* (Jaglic şi Cervinkova 2012).

Patogenii ESKAPE. Eforturile în scopul identificării şi dezvoltării terapiilor antimicrobiene eficiente se concentrează asupra unei categorii de şase patogeni umani cu rezistenţă sporită la antibioticele administrate uzual. Aceste bacterii au o semnificaţie clinică deosebită, fiind adesea implicaţi în infecţii nosocomiale: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae*.

5.13. Necesitatea de noi antibiotice

Datorită rezistenţei bacteriene la antibiotice, transferate interspecific prin transfer lateral de gene, a transformării speciilor bacteriene inofensive în variante patogene, în special prin achiziția unor gene de virulenţă (tot prin HGT) şi a structurilor reziliente precum biofilmul, necesitatea de noi antibiotice mai eficiente, mai puţin toxice este o cerinţă permanentă dar mai ales stringentă.

Metodele de ameliorare a producţiei de antibiotice. Terapia antiinfecţioasă se află în impas datorită fenomenului de rezistenţă multiplă la antibiotice, întâlnit tot mai frecvent la bacterii. Acest fenomen ar putea fi depăşit cu succes doar de noi clase de antibiotice, care să acţioneze prin mecanisme diferite de cele ale antiinfecţioaselor utilizate în prezent. Din păcate, descoperirea şi dezvoltarea de antibiotice complet noi se dovedeşte a fi practic imposibilă în acest moment, fiind limitată de nivelul de cunoaştere existent, dar şi dificilă, costisitoare şi consumatoare de timp. Din această cauză obţinerea unor antibiotice noi prin extinderea înţelegerii şi dezvoltarea de noi tehnici (*knowledge and know-how*) este limitată la abordări precum:

1. Fuziunea protoplaştilor bacterieni sau fungici. Cele două tulpini celulare (bacteriene, respectiv fungice) supuse procedeului fuziunii, trebuie sa sintetizeze două antibiotice diferite, din aceiaşi familie. Prin cuplarea artificială a celor două căi de biosinteză poate să rezulte un nou antibiotic (un antibiotic hibrid). Fuziunea protoplaştilor se poate utiliza în scopul creşterii randamentului producţiei de antibiotice. Se procedează la fuziunea protoplaştilor unei tulpini

bacteriene înalt producătoare, care creşte încet sau este pretenţioasă la condiţiile de creştere, cu o linie bacteriană care face sinteza antibioticelor cu o rată inferioară, dar se dezvoltă repede şi nu are exigenţe nutritive deosebite. Prin fuziune rezultă organisme care cumulează proprietăţi noi, convenabile atât în ceea ce priveşte producţia de antibiotice, cât şi exigenţele nutritive.

2. **Amplificarea genică** este o altă modalitate de creştere a ratei de sinteză a antibioticelor. Genele codificatoare ale sintezei antibioticelor sunt cromosomale şi extracromosomale (plasmidiale). Numărul plasmidelor per celulă este variabil în funcţie de tipul de control pe care celula îl exercită: un control riguros are ca efect existenţa unui număr mic de plasmide în celulă (1-5 copii); un control relaxat permite creşterea numărului de copii plasmidiale per celulă (50-l0 copii). În aceste condiţii, dacă genele codificatoare ale sintezei antibioticului sunt plasmidiale, randamentul sintezei creşte foarte mult.

3. **Transferul genelor codificatoare** ale sintezei unui antibiotic, prin tehnologia ADN recombinat, nu este uşor realizabil, deoarece nu toate genele implicate în căile de biosinteză se cunosc, sau uneori acestea sunt dispersate. De aceea, s-a recurs la un artificiu: se încearcă mărirea producţiei de antibiotic prin grefarea unor gene promotor foarte eficiente, care să grăbească intrarea în acţiune a operonului codificator. Tehnicile de inginerie genetică au permis exprimarea heterologă a unor antibiotice.

4. **Biosinteza mutaţională sau mutasinteza,** o altă cale pentru ameliorarea producerii de antibiotice se bazează sinteza pornind de la un produs iniţial (precursor), printr-o suită de etape intermediare. În această tehnologie se folosesc microorganisme mutante, cu incapacitatea de a realiza sinteza unui produs, aproape de capătul lanţului de sinteză. Dacă în mediul de creştere se adaugă precursorul natural, microorganismul produce antibioticul natural. Dacă în mediul de cultură se adaugă un alt compus, modificat (de sinteză chimică), celulele încorporează acest produs chimic nou şi sinteza este orientată în funcţie de natura precursorului furnizat.

Pentru producerea antibioticelor noi, industria de biosinteză a utilizat două căi majore:

I. Prin procedee de mutageneză s-a urmarit selecţia unor tulpini înalt producătoare. Pe această cale, randamentul biosintezei de antibiotice s-a ameliorat permanent. Procedeul este foarte laborios, deoarece mutageneza este o metodă oarbă, ce presupune testarea a mii şi mii de tulpini celulare, după iradiere cu raze UV, raze X sau după tratamentul cu substanţe mutagene (azotiperită sau gaz muştar). Această metodă este tipică pentru producerea penicilinei, cu tulpini mutante de *P. chrysogenum*. Randamentul tulpinilor actuale, obţinute prin mutageneză cu radiaţii gamma, este de mii de ori superior faţă de cel al tulpinii originale.

II. Producerea de antibiotice cu un oarecare grad de modificare chimică, prin procedeul semisintezei. Metoda constă în grefarea unui radical chimic pe o moleculă de antibiotic, produsă pe o cale naturală.

Perspectivele promiţătoare în descoperirea şi dezvoltarea de noi antibiotice sunt cele ţintite:

1. **Simularea *in silico*** prin metode de analiză şi modelare bioinformatică are avantajul de a fi precisă şi rapidă, în ajutorul cercetărilor *in vitro* şi preclinice: legarea moleculei medicamentoase de receptori, ancorarea moleculară, farmacocinetică, toxicitate etc. Este utilizată şi pentru compuşi noi, dar şi în scopul repoziţionării pentru noi indicaţii a unor medicamente

disponibile pentru uz terapeutic, pentru care se evidenţiază o activitate de interes (antimicrobiană) sau apar noi dovezi clinice. Acestea sunt reintroduse în studii care să stabilească modul de administrare, doza, toxicitatea, să confirme siguranţa şi eficacitatea pentru noua indicaţie.

2. Utilizarea inteligenţei artificale pentru identificarea unor posibile ţinte moleculare. Prin amprentare fenotipică şi/sau genotipică se pot crea imense baze de date care să fie apoi analizate pentru detectarea unor „puncte slabe” în patogeni.

3. Identificarea şi caracterizarea efectelor unor anumite grupări din moleculele medicamentelor şi prepararea sintetică a analogilor modificaţi, care să abordeze direct mecanismele rezistenței sau efectele secundare prin ***pocket-based drug design***.

Metode de detectare a noilor antibiotice

A. Sondarea primară

- Metoda culturilor în plăci;
- Metoda inoculării directe cu sol;
- Metoda striurilor încrucişate;
- Metoda decupajelor din agar;
- Metoda cultivării *in situ* pentru VBNC (de exemplu tehnologia *iChip*).

B. Sondarea secundară

Microorganismele selectate în etapa A se cultivă pe medii optime de cultură, apoi se extrage antibioticul din mediu. În procedeul clasic se realizează rondele de hârtie impregnate cu antibiotic şi se testează pe microorganisme test. Noile tehnologii implică tehnici de HTS.

C. Testarea altor proprietăţi

Pentru ca un antibiotic să poată fi utilizat în terapie trebuie să fie caracterizat în detaliu în ce priveşte:

- Toxicitatea pentru animale prin injecţii intraperitoneale;
- Capacitatea hemolitică;
- Capacitatea de legare a componentelor serului;
- Inactivarea de către enzimele din organismele test;
- Stabilitatea la acid (la cele cu administrare orală);
- Potenţialul teratogen;
- Fitotoxicitatea (la cele utilizate în agricultură);
- Absorbabilitate şi toxicitate slabe (în cazul antibioticelor folosite pentru tratarea alimentelor).

D. Evaluarea avansată în laborator: stabilirea tuturor condiţiilor optime de sinteză;

E. Producţia în staţia pilot;

F. Producţia la scară industrială;

G. Certificarea şi autorizarea;

H. Finanţarea şi lansarea produsului pe piaţă.

Cei trei laureaţi ai Premiului Nobel pentru Chimie (2009), Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz şi Ada Yonath au contribuit independent la descifrarea structurii tridimensionale a ribosomilor, a mecanismelor de acţiune a multor antibiotice şi a rezistenţei antimicrobiene. Cercetările au condus spre elucidarea mecanismelor de biosinteză ribosomală şi generarea unor aplicaţii biotehnologice pentru producţia de noi antibiotice prietenoase cu mediul înconjurător. Se

încearcă proiectarea de antibiotice optimizate molecular în ceea ce privește proprietățile lor chimice, toxicitatea, penetrarea celulară și spectrul de acţiune la nivel de specii patogene, cu posibilitatea de a prezerva microbiomul (care este deteriorat neintenționat de antibioticele actuale), precum și creșterea biodegradabilității cu scopul reducerii pericolelor ecologice cauzate de componentele nedegradabile ale metaboliților actuali ai antibioticelor.

5.14. Cele mai noi antibiotice

Medicamentele antiinfecţioase recent lansate pe piaţă includ multe combinaţii de antibiotice deja cunoscute, precum cefalosporine sau carbapeneme şi inhibitori de beta-lactamaze. Puţine molecule noi au fost dezvoltate în ultimii ani, destinate mai ales terapiei infecţiilor cu germeni multirezistenţi (**Tabel 3**). Cele mai multe dintre acestea sunt molecule semisintetice sau sintetice ce aparţin marilor clase de antibiotice. Singura moleculă naturală este fidaxomicina, obţinută cu ajutorul actinomicetelor.

Tabel 3. Cele mai noi antibiotice.

Denumire	**Anul aprobării**	**Tipul antibioticului**	**Spectrul de acţiune**
Tigeciclina	2005	Glicilciclină de sinteză	Germeni multirezistenţi precum *E. coli* şi *K. pneumoniae*, enterococi sensibili la vancomicină (VSE), MRSA
Retapamulina	2007	Prima pleuromutilină de uz uman, antibiotic semisintetic	Stafilococi şi streptococi, uz topic în impetigo
Telavancina	2009	Lipoglicopeptidă semisintetică derivată din vancomicină	Germeni Gram-pozitivi multirezistenţi precum MRSA
Ceftarolina	2010	Cefalosporină semisintetică de generaţia a V-a	Spectru larg, germeni multirezistenţi
Fidaxomicina	2011	Antibiotic macrociclic	Spectru restrâns, *Clostridium difficile*
Oritavancina	2014	Glicopeptidă semisintetică derivată din vancomicină	Germeni Gram-pozitivi multirezistenţi, potenţial *B. anthracis*
Dalbavancina	2014	Lipoglicopeptidă semisintetică derivată din teicoplanină	Germeni Gram-pozitivi multirezistenţi precum MRSA, *Staphylococcus epidermidis, S. pyogenes*
Tedizolid	2014	Florochinolonă sintetică	Rezervat în tratamentul infecţiilor complicate ale pielii (bacterii Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* inclusiv MRSA, *Streptococcus pyogenes, S. agalactiae*, grupul *S. anginosus*)
Eravaciclina	2018	Florociclină sintetică	Bacterii multirezistente: *Enterobacteriaceae, Acinetobacter*, MRSA, germeni anaerobi din genul *Bacteroides*
Plazomicina	2018	Antibiotic aminoglicozidic semisintetic derivat din sisomicină	Bacterii multirezistente implicate în infecţii urinare: *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii*, MRSA, VRSA
Sareciclina	2018	Tetraciclină semisintetică	Spectru restrâns, activă asupra *Cutibacterium acnes*
Cefiderocol	2020	Cefalosporină sintetică de generaţia a IV-a	Bacterii multirezistente responsabile de pneumonii intraspitaliceşti sau asociate ventilării mecanice
Lefamulina	2020	Pleuromutilină semisintetică	Bacterii Gram-pozitive şi bacterii atipice responsabile de pneumonii comunitare

Antibiotice aflate în diverse stadii de cercetare

În prezent, circa 50 de molecule candidat sunt investigate în studii clinice, iar cercetarea preclinică demonstrează mai multă inovație și diversitate, 252 de agenți fiind dezvoltați pentru a trata agenții patogeni prioritari. Câteva exemple:

• MK-7655 (Merck & Co) conţine imipenem, relebactam şi cilastatin (carbapenemă, monobactam şi inhibitor de carbapanemaze), iar ATM-AVI (AstraZeneca şi Allergan) conţine aztreonam şi avibactam (monobactam şi inhibitor de beta-lactamaze);

• S649266 (Shionogi Inc.) este o cefalosporină de nouă generaţie;

• BAL30072 (Basilea Pharmaceutica) este un sulfactam activ asupra *Acinetobacter baumannii*;

• Omadaciclina (Paratek Pharmaceuticals) este o nouă tetraciclină semisintetică, investigată pentru administrare intravenoasă şi orală;

• Solitromicina (Cempra) este un macrolid investigat împotriva infecţiilor cu bacterii Gram-pozitive şi Gram-negative pretenţioase;

• Zabofloxacina (Dong Wha Pharmaceutical) este o florchinolonă investigată împotriva patogenilor tractului respirator;

• Finafloxacina (MerLion Pharmaceuticals) este investigată pentru eficienţa în cazul otitelor şi al infecţiilor cu *Helycobacter pylori*. Nemonoxacina (TaiGen Biotechnology) este o chinolonă nefluorinată cu spectru larg şi administrare orală sau intravenoasă;

• Gepotidacina (GSK2140944, GSK) şi Zoliflodacina (ETX0914/AZD0914, Entasis/Astra Zeneca) sunt molecule ce inhibă subunitatea B a girazei, inhibând astfel replicarea ADN;

• Noi oxazolidinone sunt investigate pentru tratarea infecţiilor cu: *Clostridium difficile* (cadazolid, Actelion Pharmaceuticals); MRSA şi VRE (MRX-1, MicuRx Pharmaceuticals Inc.); *Mycobacterium tuberculosis* (sutezolid, Sequella);

• Debio 1452, Debio 1450 (Debiopharm Group) şi CG400549 (CrystalGenomics) sunt inhibitori ai biosintezei acizilor graşi;

• Iclaprim (Motif Bio) este o diaminopirimidină cu mecanism de inhibiţie a sintezei folaţilor, având efect bactericid împotriva stafilococilor.

Şi totuşi, după 25 de ani de când nu s-au realizat progrese majore în descoperirea de noi antibiotice, în anul 2015 a fost descoperită **teixobactina**, o moleculă naturală ce promite dezvoltarea unei noi clase de antibiotice (Ling şi colab. 2015). Teixobactina este podusă de *Eleftheria terrae*, bacterie viabilă dar slab cultivabilă din sol. Izolarea tulpinii producătoare a fost îmbunătățită cu ajutorul dispozitivului iChip – tehnică HTS. Este un compus depsipeptidic macrociclic sintetizat de NRPS codificate de genele *txo1* şi *txo2*.

Mecanismul de acţiune al teixobactinei: inhibă sinteza peretelui celular prin legarea de lipide II (precursori ai peptidoglicanului) și lipide III (precursori ai acidului teicoic). Acest mecanism de acţiune se pare că poate preveni fenomenul de rezistenţă. Spectrul de acţiune: activă asupra bacteriilor Gram-pozitive precum *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile, Bacillus anthracis* şi a enterococilor. Nu este activă asupra bacteriilor Gram-negative, al căror perete celular este protejat de membrana externă.

O altă moleculă naturală este **lugdunina** produsă de *Staphylococcus lugdunensis*, bacterie recent izolată din mucoasa nazală, specifică microbiomului uman (Zipperer şi colab. 2016). Este o peptidă ciclică sintetizată neribosomal, activă asupra *Staphylococcus aureus*.

6. ALŢI AGENŢI ANTIINFECŢIOŞI ŞI ANTIPARAZITARI PRODUŞI PRIN BIOSINTEZĂ

Terapia antimicotică actuală utilizează în mare parte substanţe medicamentoase obţinute prin sinteză chimică, însă o serie de compuşi naturali cu acţiune antifungică sunt disponibili comercial. Descoperite acum mai bine de 7 decenii, griseofulvina, nistatina şi amfotericina B se regăsesc şi azi în lista medicamentelor esenţiale a WHO, datorită eficienţei şi siguranţei lor.

Griseofulvina este un agent antimicotic descoperit în anul 1939, produs de *Penicillium griseofulvum*. Este indicată în tratamentul dermatofitozei (*tinea corporis*) cauzată de ciuperci din genurile *Trichophyton, Microsporum* şi *Epidermophyton*. Mecanismul de acţiune constă în perturbarea mitozei, interferând cu microtubulii fusului de diviziune. De asemenea, se leagă de keratină, ceea ce o face eficientă în cazul micozelor scalpului şi ungiilor. Griseofulvina a fost clasificată ca medicament teratogen, prin urmare se administrează pe cale orală cu precauţii.

6.1. Polienele

Polienele sunt compuşi macrociclici (**Figura 30**) obţinuţi cu ajutorul streptomicetelor, cu acţiune antifungică şi antiparazitară. Polienele naturale aflate în terapie sunt:

- **Nistatina** (1954) produsă de *Streptomyces noursei;*
- **Amfotericina B** (1958) produsă de *Streptomyces nodosus;*
- **Candicidina** (1964) produsă de *Streptomyces griseus;*
- **Natamicina** (1978) produsă de *Streptomyces* sp.

Nistatina este un agent fungic descoperit în anul 1950 de cercetătoarele Rachel Fuller Brown şi Elizabeth Lee Hazen. Este un polichetid din clasa macrolidelor produs de *Streptomyces noursei*. Molecula constă într-un inel macrolactonic de 38 de atomi la care este ataşat un zahar aminat. Analiza clusterului de gene responsabil de biosinteza nistatinei a dus la identificarea a șase gene care codifică o PKS de tip I modulară (*nysA, nysB, nysC, nysI, nysJ* şi *nysK*), precum şi alte gene *nis* responsabile de eliberarea şi ciclizarea agliconului, biosintezei glucidului, modificării macrolactonei prin hidroxilare, glicozilare, metilare şi acilare, transportului moleculelor și proteine reglatoare. S-a descoperit că una dintre genele care codifică PKS, *nysC,* codifică cel mai mare PKS modular, compus din 11.096 aminoacizi (Brautaset şi colab. 2000). Nistatina se leagă de moleculele de ergosterol, inhibând sinteza peretelui celular la fungi, iar la concentraţii mari permeabilizează membrana celulară, modifică potenţialul şi transportul membranar. Este activă asupra fungilor *Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis* etc. Produsele farmaceutice combinate care conțin nistatină, neomicină, gramicidină D și triamcinolonă sunt indicate în tratamentul dermatozelor cu reacție la corticosteroizi, cauzate de infecții bacteriene sau micotice. În combinație cu metronidazol, nistatina este indicată pentru tratamentul infecțiilor mixte datorate *Trichomonas vaginalis* și *Candida albicans*.

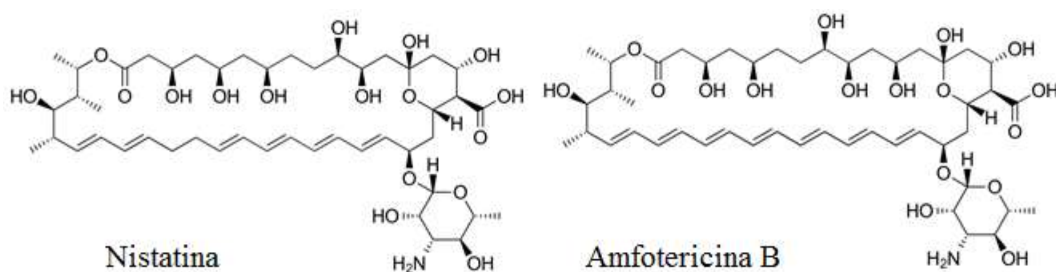


Figura 30. Structura unor poliene naturale.

Amfotericina B este tot un inel macrolactonic de 38 de atomi, glicozilat. Clusterul de gene implicate în sinteza amfotericinei B (gene *amph*) la *S. nodosus* este foarte asemănător cu grupul de gene biosintetice pentru nistatină la *S. noursei*. Genele analoge apar în aceeași ordine în ambele grupuri şi prezintă un grad ridicat de identitate a secvenței, ceea ce sugerează o ascendență comună relativ recentă (Caffrey şi colab. 2001). Amfotericina B este cel mai important agent antifungic, cu mecanism de acţiune similar nistatinei, având mare afinitate pentru ergosterol. Este indicată infecţiilor sistemice şi invazive precum mucormicoza, meningita criptococică, anumite candidoze şi aspergiloze. Amfotericina B este utilizată şi pentru infecțiile cu protozoare care pun viața în pericol, cum sunt leishmanioza viscerală și meningoencefalita amebiană primară. Administrarea poate fi însoţită de efecte secundare grave, a căror frecvenţă şi intensitate a fost redusă prin formularea liposomală.

Candicidina este chiar mai eficientă decât amfotericina B împotriva candidozelor, iar natamicina (pimaricina) se recomandă în micoze provocate de specii ale genurilor *Candida, Aspergillus, Cephalosporium, Fusarium* şi *Penicillium.* Amfotericina B se administrează oral sau intravenos, pe când celelalte poliene se aplică local (Carolus şi colab. 2020).

6.2. Avermectinele

Avermectinele sunt derivați lactonici macrociclici cu puternice proprietăți antiparazitare, ce intră în compoziţia unor medicamente și pesticide utilizate pentru combaterea vectorilor biologici. Acești compuși naturali descoperiţi în anul 1978 sunt generați ca produse de fermentaţie de către *Streptomyces avermitilis*, un actinomicet izolat din sol în Japonia. În anul 2015 cercetătorii William Campbell și Satoshi Ōmura au fost recompensaţi cu Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină pentru descoperirea avermectinei şi analogilor săi. Derivaţii avermectinei includ ivermectina, selamectina, doramectina, eprinomectina și abamectina. Sunt de regulă izolate în perechi de compuși omologi, cu o componentă majoră și una minoră (**Figura 31**).

Biosinteza avermectinei. Clusterul de gene pentru biosinteza avermectinei de la *Streptomyces avermitilis* a fost secvențiat şi adnotat, acesta codificând enzime responsabile pentru un mecanism în patru etape:

1. Producerea unităţii starter;
2. Formarea agliconului de avermectină prin sintetizări polichetidice;
3. Modificarea agliconului;
4. Glicozilarea agliconului de avermectină modificat.

Unităţile starter au la bază 2-metilbutiril-CoA formată din izoleucină şi respectiv izobutirl-CoA formată din L-valină, legate şi modificate de aminoacid-transaminază şi α-ceto-dehidrogenază (codificate de gene *bkdABC* şi *bkdEFG*). Sunt extinse cu șapte unități de acetat și cinci unități de propionat pentru a produce seria avermectină A şi respectiv B. Agliconul inițial al avermectinei este sintetizat prin activitatea unui complex de patru enzime similare PKS de tip I: AVES 1, AVES 2, AVES 3 și AVES 4. Agliconul inițial este eliberat ulterior din domeniul tioesterazei AVES 4, prin formarea unui ester ciclic intramolecular. Multiple gene *ave* codifică enzime ce modifică în continuare agliconul inițial al avermectinei: *AveE* are activitate de monooxigenază a citocromului P450; *AveF* are activitate de cetoreductază dependentă de NAD(P)H; *AveC* influențează activitatea dehidratazei; *AveD* are activitate de O-metiltransferază. Proteine codificate de *AveC* sau *AveD* acționează asupra agliconului, determinând dacă agliconul rezultat va produce seria avermectină A sau B și respectiv 1 sau 2. Nouă cadre deschise de citire (*orf1* și *aveBI-BVIII*) situate în aval de *aveA4* sunt implicate în sinteza componentei glucidice, iar *AveBI* este responsabil pentru glicozilarea agliconului avermectinei (Yoon şi colab. 2004).

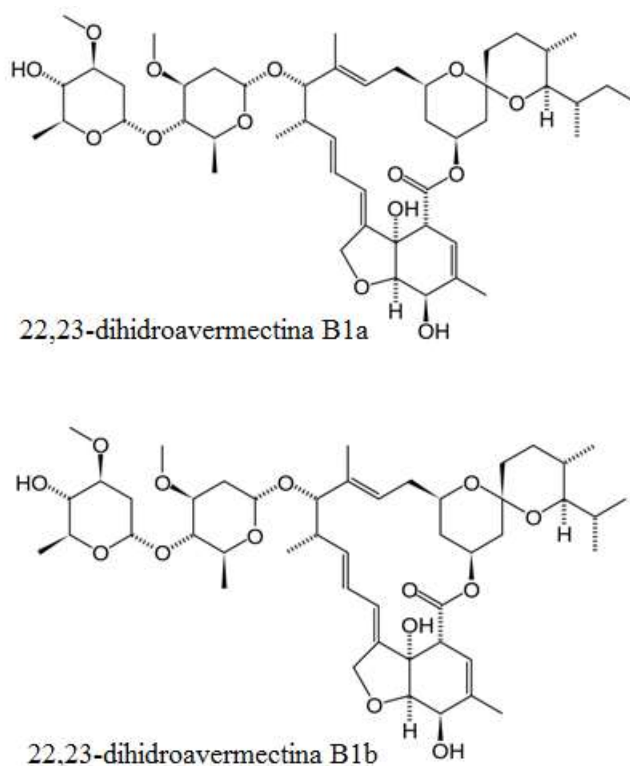


Figura 31. Structura celor doi omologi de ivermectină, produşi în raport de 80:20.

Mecanismul şi spectrul de acţiune al avermectinelor. Eficacitatea avermectinelor în tratarea unui spectru larg de infecții parazitare este bine stabilită, iar modul de acțiune este complex. Ivermectina (22,23-dihidroavermectina) este un medicament antiparazitar lansat pe piaţă în anul 1981, recomandat în cazuri de infestări diverse: pediculoză, scabie, oncocercioză, filarioză, tricuriază, schistosomiază, ascaridioză, oxiuroză. Este destinat uzului uman şi veterinar, cu administrare orală, parenterală, topică sau ca aplicaţie spot. Acţionează asupra sistemului nervos, inhibând neurotransmiţătorii. La concentrații nanomolare afectează motilitatea nematodelor, hrănirea și reproducerea, acționând prin canale ionice ligand-dependente, în special cele de clorură cu glutamat. Acest tip de canale nu sunt prezente la vertebrate și, ca atare, conferă o marjă de siguranță. Cu toate acestea, la concentrații micromolare, ivermectina poate interacționa cu o gamă

mai largă de canale ligand-dependente prezente atât la nevertebrate, cât și la vertebrate, inclusiv receptorii acidului gamma-aminobutiric (GABA), glicinei, histaminei și receptorii nicotinici ai acetilcolinei. Se înregistrează şi fenomene de rezistenţă la ivermectină a nevertebratelor (Laing şi colab. 2017).

În ciuda structurii chimice asemănătoare cu cea a antibioticelor macrolide, derivaţii de avermectină nu au acţiune antibacteriană. În prezent, ivermectina se află în investigaţii pentru proprietăţile sale antivirale, cu accent pe capacitatea sa de a inhiba replicarea SARS-CoV-2 (Caly şi colab. 2020). Mai multe studii au raportat efecte antivirale ale ivermectinei asupra ribovirusurilor precum virusurile Zika, Dengue, febrei galbene, West Nile, Hendra, Newcastle, encefalitei ecvine, Chikungunya, gripei aviare tip A, sindromului reproductiv și respirator porcin, virusul imunodeficienței umane de tip 1 (HIV-1) și coronavirusul sindromului respirator acut sever (SARS-CoV). Mai mult, există unele studii care arată efectele antivirale ale ivermectinei împotriva virusurilor ADN, cum sunt virusurile herpes ecvin tip 1, herpes bovin tip 1, pseudorabic, circovirus porcin 2 sau polyomavirus BK. Ivermectina interferează cu mai multe mecanisme biologice, prin urmare ar putea servi ca potențial candidat în tratamentul unei game largi de boli virale. Studiile *in vivo* pe modele animale indică o diversiate de efecte antivirale ale ivermectinei, însă sunt necesare studii clinice pentru a evalua eficacitatea potențială a moleculei în context terapeutic (Heidary şi Gharebaghi 2020). Foarte recent, datele unui studiu clinic retrospectiv indică o scădere semnificativă a mortalităţii la pacienţii COVID-19 care au fost trataţi cu ivermectină (Cepelowicz Reiter şi colab. 2021).

6.3. Artemisinina

A fost descoperită în anul 1972 de către cercetătoarea de origine chineză Tu Youyou, co-laureată a Premiului Nobel pentru Medicină în anul 2015. Medicamentele care conțin un derivat de artemisinină (terapii combinate cu artemisinină) constituie acum tratament standard la nivel mondial pentru malaria cauzată de *Plasmodium falciparum*, malaria datorată altor specii de *Plasmodium* şi împotriva unor viermi paraziţi. Tratamente disponibile împotriva malariei:

- Chinina – alcaloid extras din *Cinchona officinalis;*
- Clorochina – în trecut cel mai utilizat antimalaric, însă nu se mai foloseşte din cauza rezistenţei. Hidroxiclorochina este studiată ca tratament potenţial în boala COVID-19, însă rezultatele nu sunt promiţătoare. Un studiu clinic a fost oprit din motive de siguranţă. În asociere cu remdesivir, hidroxiclorochina reduce activitatea antivirală a acestuia;
- Amodiachina, pirimetamina, proguanilul, sulfonamidele, meflochina, primachina, atovaquona, halofantrina, lumefantrina – substanţe medicamentoase sintetice;
- Doxiciclina, clindamicina (antibiotice semisintetice derivate din tetraciclină) şi lincomicina;
- Riboflavina este de asemenea suplimentată.

Din punct de vedere chimic, artemisinina este o lactonă sesquiterpenică care conține o punte de peroxid neobișnuită, rar întâlnită la compuşii naturali. Inelul 1,2,4-trioxan endoperoxid este responsabil pentru mecanismul de acțiune al medicamentului (**Figura 32**).

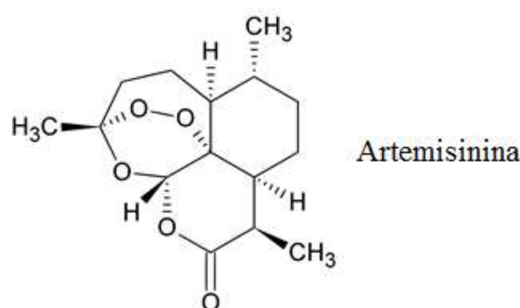


Figura 32. Structura artemisininei.

Artemisinina este izolată din pelin dulce (*Artemisia annua*), plantă folosită în medicina tradițională chineză. Utilizarea microorganismelor transgenice precum *Saccharomyces cerevisiae* sau *E. coli* biotransformate au generat precursori ai artemisininei (dihiroartemisina) în timp scurt şi mult mai eficient decât prin metoda extractelor vegetale (Zeng şi colab. 2008). Au fost create căi de sinteză a acidului artemisinic în celule de *E. coli* (25g/L) pe calea 1-deoxi-D-xilulozo 5-fosfatului sau în *S. cerevisiae* (40g/L) pe calea mevalonatului. Ulterior, acidul artemisinic este transformat în artemisinină prin conversie chimică (Paddon şi Keasling 2014).

Artemesinina, agent antimalaric de primă linie, are un mod de acțiune complet diferit de antimalaricele convenționale. Este deosebit de utilă în tratamentul infecțiilor cu protozoare rezistente. Compuşii cu artemisinină produc o reducere foarte rapidă a biomasei parazitare, cu îmbunătăţirea simptomelor clinice, determinând în acelaşi timp o reducere a transmiterii gametocitelor protozoarului, ceea ce scade potențialul de răspândire a genelor de rezistență. Pentru a preveni dezvoltarea rezistenței la acest medicament, este recomandat numai în combinație cu o altă terapie care nu este bazată pe artemesinină. Totuşi, rezistența la artemesinină a fost recent raportată, ceea ce constituie o situaţie dezastruoasă în lupta împotriva malariei (Dondorp şi colab. 2009).

7. ALTE MEDICAMENTE PRODUSE PRIN BIOTEHNOLOGII DE FERMENTAŢIE

7.1. Macrolide cu activitate imunosupresivă

Câţiva compuşi activi din clasa macrolidelor nu manifestă proprietăţi antimicrobiene, dar se remarcă prin activitatea imunosupresivă: tacrolimus, sirolimus şi pimecrolimus (**Figura 33**).

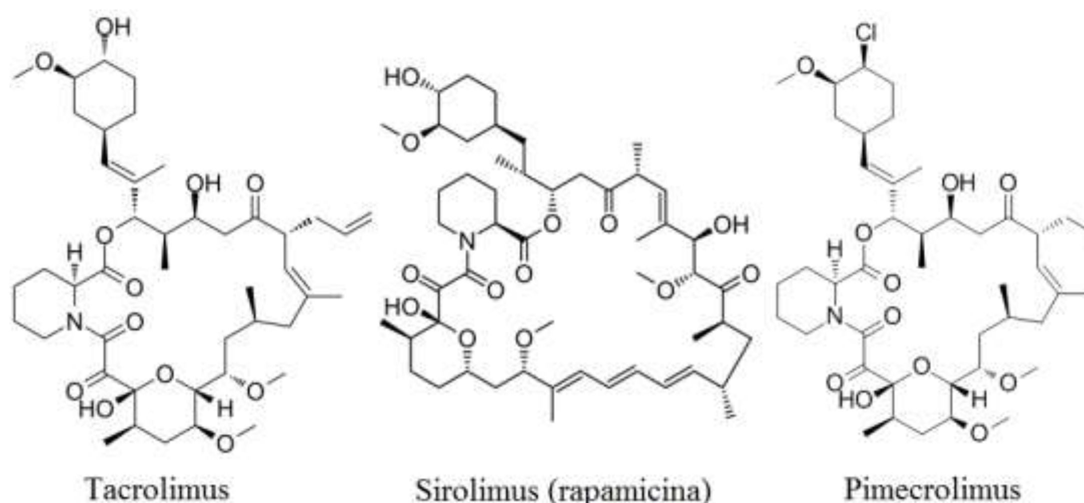


Figura 33. Structura macrolidelor imunosupresoare.

Tacrolimus a fost descoperit în anul 1984 ca un metabolit secundar al actinomicetului *Streptomyces tsukubaensis* izolat dintr-o probă de sol în Japonia. Primul medicament a fost aprobat în 1994 pentru utilizare în caz de transplant hepatic, iar ulterior indicaţiile s-au extins la alte tipuri de transplant, implantul stenturilor, dermatită atopică, boli autoimune şi inflamatorii. Studiile indică activitate neuroprotectivă, neuroregenerativă, antivirală, dar şi potenţial anticancerigen şi antialergen. Tacrolimus este un polichetid sintetizat de un sistem enzimatic complex PKS de tip I-NPRS codificat de clusterul *fkb*, ce conţine cel puţin 19 gene. Stategiile de îmbunătăţire a biosintezei se concentrează pe optimizarea condiţiilor de cultură şi reducerea produşilor secundari ai fermentaţiei, precum ascomicina. Studiile de genomică, transcriptomică, proteomică şi metabolomică au scopul de a descifra fiziologia acestui important microorganism, cu scopul manipulării acestuia pentru creşterea productivităţii şi reducerea costurilor de producţie (Ordóñez-Robles şi colab. 2018).

Sirolimus (rapamicina), lansat pe piaţă în anul 1999, este produs de *Streptomyces hygroscopicus* ce a fost mai întâi izolat din probe de sol de pe Insula Paştelui. Biosinteza este dirijată de PKS constând în trei enzime multifuncţionale (RapA, RapB şi RapC), organizate în 14 module, şi NRPS codificate şi reglate de o suită de gene *rap*. Este un compus macrociclic natural cu 31 de atomi care manifestă activitate farmacologică vastă, având acţiune imunosupresivă, antifungică, antitumorală, neuroprotectivă şi împotriva îmbătrânirii. Este utilizată împotriva respingerii în transplantul de organe, împreună cu ciclosporină şi steroizi, dar şi în afecţiuni

autoimune. Derivaţii semisintetici ai rapamicinei deferolimus, everolimus şi temsirolimus manifestă proprietăţi anticancerigene (Park şi colab. 2010).

Pimecrolimus a fost aprobat în anul 2001 pentru tratamentul dermatitei atopice şi eczemelor. Este un medicament semisintetic derivat din ascomicină, un polichetid macrociclic cu 23 de atomi, analog al moleculei de tacrolimus. Ascomicina este produsă de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (Sambyal şi Singh 2020).

7.2. Agenţi antihiperlipidemici şi antiarteriosclerotici

Agenţii antihiperlipidemici şi antiarteriosclerotici sunt un grup divers de produse farmaceutice care au rolul de a reduce nivelul colesterolului sangvin, întrucât un nivel ridicat al lipoproteinelor cu densitate joasă (*low density lipoproteins* – LDL) este asociat cu boli cardiovasculare. Dacă înainte de implementarea terapiilor cu antibiotice, principala cauză a mortalităţii pe Glob o reprezentau bolile infecţioase, în prezent afecţiunile cardiovasculare consituie riscul principal de deces. Există mai multe tipuri de preparate medicamentoase ce au rolul de a reduce nivelul lipidelor. Suplimentele alimentare cu fitosteroli reduc absorbţia colesterolului, iar medicamentele obţinute biotehnologic (statinele) sau prin sinteză chimică (fibraţii, niacina, sechestranţii acizilor biliari etc) scad colesterolemia şi trigliceridemia.

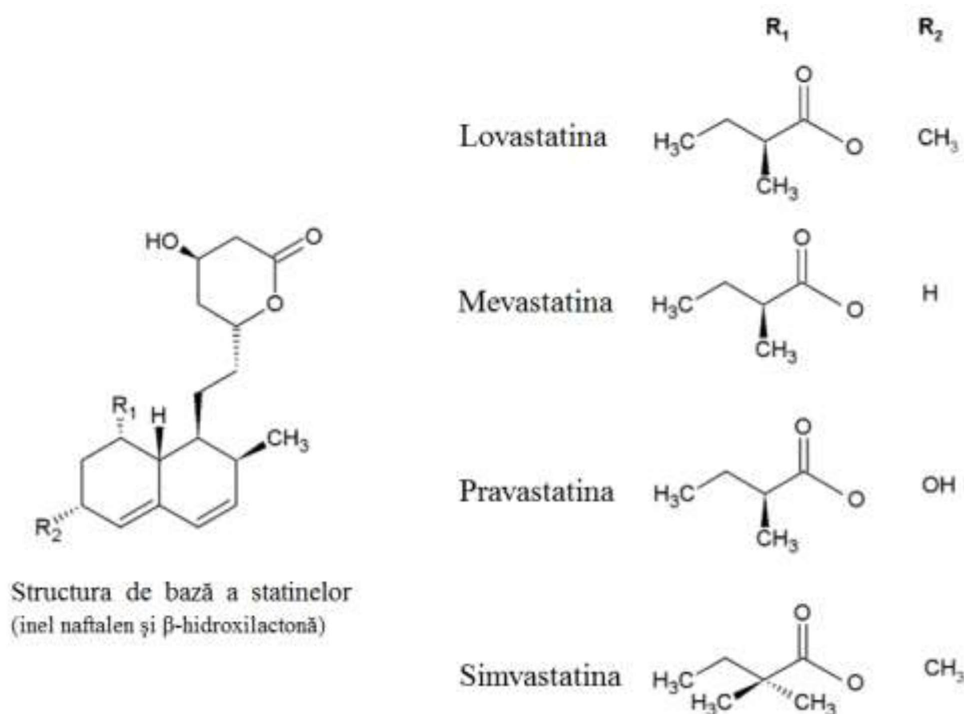


Figura 34. Structura statinelor naturale şi bioderivate.

Statinele, cunoscute și sub numele de inhibitori ai HMG-CoA reductazei, sunt o clasă de medicamente cu o piaţă de miliarde de dolari. Având ca efect scăderea nivelului lipidelor sangvine, există dovezi puternice ce susţin eficienţa statinelor în tratarea bolilor cardiovasculare la persoanele cu risc crescut, dar fără boli cardiovasculare (prevenirea primară) şi la pacienţii aflaţi în stadiile incipiente ale bolii (prevenirea secundară). Dintre statinele disponibile pe piaţă, **lovastatina**

(Mevacor, Altocor, Altoprev), **mevastatina** (Compactin), **pravastatina** (Pravachol, Selektine, Lipostat) sunt obţinute biotehnologic iar **simvastatina** (Zocor, Lipex) este semisintetică.

Statinele naturale sunt metaboliţi secundari fungici şi pot fi obținute cu ajutorul unor fungi filamentoşi. Lovastatina este produsă în principal de tulpini de *Aspergillus terreus* iar mevastatina de *Penicillium citrinum*. Pravastatina poate fi obținută prin biotransformarea mevastatinei de către *Streptomyces carbophilus*, iar simvastatina printr-un proces semisintetic (**Figura 34**), care implică modificarea chimică a lanțului lateral de lovastatină (Manzzoni şi Rollini 2002).

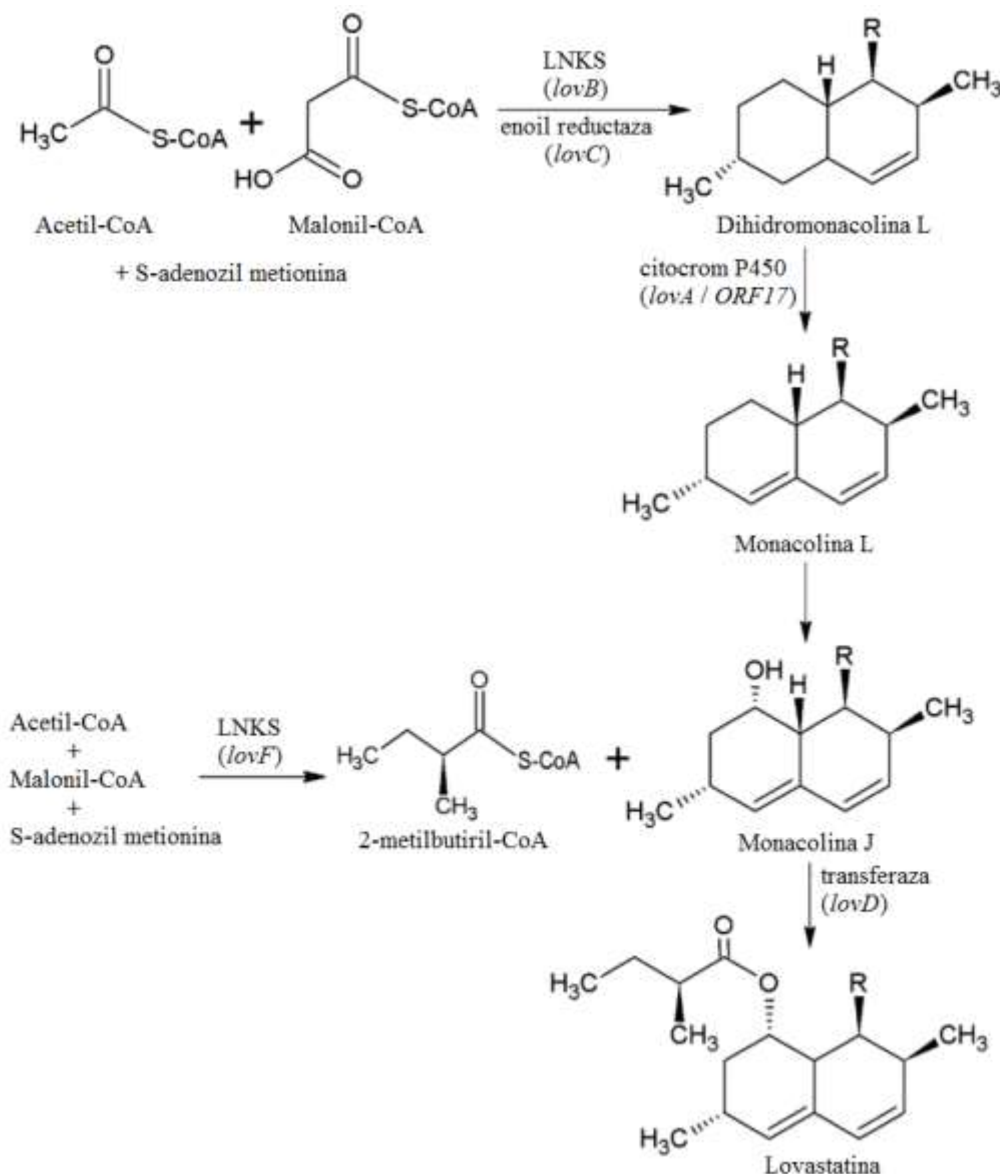


Figura 35. Biosinteza lovastatinei.

Biosinteza lovastatinei. La *A. terreus*, lovastatina este derivată din acetil-CoA şi malonil-CoA, într-o cascadă de reacţii catalizate enzimatic (**Figura 35**). Clusterul de biosinteză a lovastatinei conține două gene ce codifică PKS de tip I (*lovB* și *lovF*), responsabile de formarea a două polichetide. Enzima lovastatin-nonachetid sintetaza (LNKS) codificată de gena *lovB* este esenţială. Reductaza *lovC* interacționează cu LNKS și asigură procesarea corectă a lanțului de creștere. În continuare, acţionează oxigenaza codificată de *lovA*, şi o proteină de reglare a factorului de transcriere codificată de gena *lovE*. Există şi o a doua genă reglatoare (*lovH*) cu o structură

similară, a cărei funcţie nu este elucidată complet. Gena *lovD* codifică transesteraza ce catalizează fuzionarea celor două componente polichetidice ale lovastatinei (Barrios-Gonzales şi Miranda 2010). Odată cu descifrarea căilor biochimice și genetice ale biosintezei statinelor, a devenit posibilă obţinerea derivaților semisintetici precum simvastatina și pravastatina. Acestea pot fi obţinute prin combinarea etapelor de fermentaţie cu cele de sinteză, sau prin metode combinatorii şi de bioconversie catalizată enzimatic.

7.3. Vitamine

Vitaminele sunt micronutrienţi esenţiali, substanţe fiziologic active necesare organismului în cantităţi foarte mici, ce acţionează în calitate de coenzime în cadrul unor procese biochimice ale metabolismului. Ele nu pot fi sintetizate de către organismul animal, ci numai de plante şi anumite microorganisme. Carenţa lor generează avitaminoze, boli care se manifestă prin tulburări şi simptome caracteristice. Utilizarea vitaminelor este cantitativ dominată de industria alimentară şi sunt populare ca suplimente alimentare comercializate fără prescripţie medicală, subiect ce este intens dezbătut în comunităţile ştiinţifice. Preparatele care conţin vitamine şi minerale în doze precise, destinate uzului uman, cu administrare orală, pot fi autorizate ca suplimente alimentare.

Vitaminele, ca produse farmaceutice, sunt recomandate de către medici pentru dezvoltarea armonioasă a copiilor, pentru tratarea deficienţelor, sau asociate anumitor stări de boală (vitamina A în afecţiuni oculare, epiteliale şi reproductive; vitamina B1 la pacienţii cu diabet; vitamina B2 la pacienţii cu boli cardiovasculare şi polimorfism al genei MTHFR; vitamina B7 la pacienţii cu scleroză multiplă; vitamina B12 la pacienţii cu malabsorbţie; vitamina C la pacienţii cu cancer şi infecţii virale; vitamina D la copiii cu rahitism; vitamina E la pacienţii cu boli cardiovasculare, steatoză hepatică, arsuri, boli neurodegenerative etc). Aceste medicamente constituie preparate standardizate cantitativ şi calitativ, fiind produse conform regulilor GMP şi testate în studii clinice. Multe vitamine se regăsesc în lista medicamentelor esenţiale a WHO.

În funcţie de solubilitate, se clasifică în vitamine liposolubile (vitaminele A, D, E, K) şi vitamine hidrosolubile (vitaminele complexului B, vitamina C). Mai multe vitamine se obţin prin biotehnologii microbiene, fie în întregime, în urma unor procese fermentative, fie parţial, anumite enzime din lanţul de biotransformări fiind rezultatul metabolismului microbian (**Tabel 4-6**).

Tabel 4. Procese microbiene şi enzimatice pentru producerea vitaminelor hidrosolubile.

Vitamina	Enzima/Procesul	Microorganisme implicate
Riboflavina (Vitamina B2)	Fermentație	*Eremothecium ashbyii, Ashbya gossypii, Bacillus* sp.
Acid nicotinic (Vitamina B3)	Nitrilaza	*Rhodococcus rhodococcus*
Acid pantotenic (Vitamina B5)	Lactonohidrolaza	*Fussarium oxysporum*
Piridoxal fosfat (Vitamina B6)	Piridoxamin oxidaza	*Pseudomonas sp.*
Cobalamina (Vitamina B12)	Fermentaţie	*Propionibacterium shermanii, Pseudomonas denitrificans*
Acid L-ascorbic (Vitamina C)	Fermentaţie Reductaza acidului 2,5 diceto-D- gluconic	*Aspergillus niger, Bacillus prodigiosus* *Corynebacterium* sp., *Erwinia herbicola*
Biotina (Vitamina H)	Fermentaţie Sistem enzimatic multiplu	*Rhizopus sp. Serratia marcescens* *Bacillus sphaericus*
Nicotinamida (Vitamina PP)	Nitril hidrataza	*Rhodococcus rhodococcus*

Tabel 5. Procese microbiene şi enzimatice pentru producerea coenzimelor hidrosolubile.

Coenzima	Enzima/Procesul	Microorganisme implicate
ATP	Sistem enzimatic multiplu	*Saccharomyces cerevisiae, Corynebacterium ammoniagenes*
Coenzima A	Sistem enzimatic multiplu	*Brevibacterium ammoniagenes*
L-carnitina	Enzime ale β-oxidării Aldehid reductaza	*Agrobacterium* sp. *Sporobolomyces salmonicolor*
NAD (Nicotinamid adenin dinucleotid)	Sistem enzimatic multiplu	*Corynebacterium ammoniagenes*
NADP (Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat)	NAD-kinaza	*Brevibacterium* sp. *Corynebacterium* sp.
NADH	Formiat dehidrogenaza	*Arthrobacter* sp., *Candida boidinii*
NADPH	Glucozo 6-fosfat dehidrogenaza	*Bacillus sp.* *Gluconobacter sp.*
FAD (Flavin adenin dinucleotid)	FAD sintetaza	*Corynebacterium* sp. *Arthrobacter* sp.
PQQ (Pirolochinolin chinona)	Fermentaţie	Bacterii ce utilizează metanolul
S-adenozil metionina	S-adenozin metionin sintetaza	*Saccharomyces sake*
S-adenozil homocisteina	S-adenozin homocistein sintetaza	*Alcaligenes fecalis*

Tabel 6. Procese microbiene şi enzimatice pentru producerea vitaminelor liposolubile.

Vitamina	Enzima/Procesul	Microorganisme implicate
Calciferol (Vit D)	Ergosterol	*Claviceps purpureus,* *Penicillium notatum, Aspergillus niger*
Lanţuri laterale ale vitaminelor E şi K	Sistem enzimatic multiplu	*Geotrichum candidum, Candida* sp.
Vitamina K2	Sistem enzimatic multiplu	*Flavobacterium* sp.
Acid eicosapentaenoic	Fermentaţie	*Mortierella alpina*
Acid arahidonic	Fermentaţie	*Mortierella alpina*
Acid eicosatrienoic	Fermentaţie	*Mortierella alpina*
Acid dihomo-γ-linoleic	Fermentaţie	*Mortierella alpina*
Nicotinamida (Vit PP)	Nitril hidrataza	*Rhodococcus rhodococcus*

Avantajele economice oferite de biosinteză fac ca aceasta să fie tot mai mult utilizată. Vitaminele se pot obţine cu ajutorul bacteriilor, drojdiilor şi mucegaiurilor. Acidul ascorbic poate fi produs în cantităţi mari în mediile de cultură ale microorganismelor *Aspergillus niger* şi *Bacillus prodigiosus*. Biotina poate fi produsă în biosinteza acidului fumaric cu *Rhizopus* sp. Acidul pantotenic pot fi obţinute prin fermentaţie aerobă cu *Aerobacter aerogenes*. Procesul de sinteză chimică s-a dovedit însă mai avantajos din punct de vedere economic în cazul celor mai multe vitamine. Astfel, în prezent, doar riboflavina şi cobalamina se produc prin procese fermentative specifice biotehnologiilor. Pe lângă aceste procese realizate în totalitate cu ajutorul microorganismelor, de la precursori la compusul final, producţia câtorva vitamine include etape de bioconversie enzimatică cu ajutorul unor catalizatori obţinuţi prin fermentaţie.

Vitaminele din complexul B sunt sintetizate de microorganisme şi constituie factori esenţiali de creştere ai acestora. Acestea se acumulează intracelular sau sunt secretate în mediul de cultură. În biosinteza complexului vitaminelor B cu ajutorul *Propionibacterium technicum* se utilizează două tipuri de medii de cultură:

A. Mediul sintetic suplimentat cu tiamină şi acid pantotenic conduce la biosinteza vitaminelor în cantităţi ridcate;

B. Mediul organic conduce la biosinteza vitaminelor în cantităţi mai scăzute.

Cele mai mari cantităţi de vitamine B se găsesc în drojdii. Introducerea extractului de porumb, a malţului sau a melasei în mediul de cultură favorizează obţinerea acestor vitamine. Stimularea biosintezei se poate realiza prin adăugarea în mediul de cultură a unor precursori. Astfel, prin introducerea β-alaninei creşte conţinutul de acid pantotenic, iar introducerea componentelor piridinice şi tiazolice ale tiaminei măreşte conţinutul în tiamină. Fermentaţia cu ajutorul drojdiilor industriale nu generează o anumită vitamină B în condiţii economic avantajoase. Pasta de drojdie se suspendă în apă distilată, autolizatul de drojdie se concentrează, obţinându-se un concentrat de vitamine B, care se comercializează sub denumirea de „Complex de vitamine B", ca supliment alimentar. Reziduurile rezultate din fermentaţie se folosesc drept concentrat vitaminic în zootehnie, avicultură şi biotehnologii.

7.3.1. Biotehnologia obţinerii riboflavinei (vitamina B2)

Riboflavina un factor indispensabil al tuturor organismelor animale, micronutrient esenţial pentru diverse procese celulare: metabolismul energetic, al lipidelor, corpilor cetonici, glucidelor şi proteinelor. Cele două forme active de riboflavină, flavin adenin dinucleotid (FAD) și flavin mononucleotid (FMN), acționează în calitate de cofactori pentru oxidoreductaze, precum și ca grupe protetice pentru enzime în calea β-oxidării. Mai mult, riboflavina face parte dintr-o flavoproteină numită criptocrom, un fotoreceptor responsabil de întreținerea ritmului circadian.

Riboflavina se găseşte în cantităţi mari în lapte, brânză, ficat, rinichi, albuş de ou şi legume verzi. A fost identificată pentru prima oară în lapte, de către Blyth, în 1879. A fost izolată din mai multe surse alimentare, purificată şi caracterizată în anii 1930. Vitamina B2, riboflavina sau 6,7-dimetil-9(1'-D-ribidil)-izoaloxazina (**Figura 36**) este primul component al complexului B izolat şi identificat.



Figura 36. Structura vitaminei B2.

Procesul de sinteză chimică a fost perfecţionat, implementat şi utilizat la scară industrială până în anii 1990, când fermentaţia cu ajutorul tulpinilor modificate genetic a început să fie de interes. În prezent, riboflavina este produsă exclusiv prin fermentaţie, proces care s-a dovedit a fi mai avantajos din punct de vedere economic şi ecologic. Pentru biosinteza vitaminei B2 prin fermentaţie, se pot utiliza micromicete precum *Eremothecium ashbyii* şi *Ashbya gossypii*, drojdii (*Candida famata*), precum şi unele specii de *Clostridium*, *Lactobacillus* sau tulpini recombinate de *Bacillus subtilis, Corynebacterium ammoniagenes* şi *Lactococcus lactis.*

Cel mai des se folosesc cele două ascomicete patogene pentru bumbac, *Eremothecium ashbyii* şi *Ashbya gossypii*, care au productivitate mare prin cultivare pe medii artificiale şi nu sunt sensibile la cantităţi mari de ioni de fier. *Ashbya gossypii* produce de 40.000 de ori mai multă vitamin B2 decât are nevoie pentru propria creștere. Optimizarea procesului şi utilizarea tulpinilor rezistente la fier au condus la un randament mai mare de 20 g/L, iar procesul de biosinteză durează 6-8 zile. Fermentaţia cu ajutorul tulpinilor superproducătoare de *Bacillus subtilis* cu rezistenţă la prolină au atins o productivitate de 26,5 g/L într-un proces de 70 de ore. Comparând cele două procese industriale, obţinerea riboflavinei prin biosinteză bacteriană este mai avantajoasă, întrucât, pe lângă timpul mai scurt implică şi costuri mai reduse în etapele de separare, comparativ cu obţinerea cu ajutorul microfungilor (Averianova şi colab. 2020).

Câteva exemple de bacterii recombinate superproducătoare de riboflavină:

- Iniţial, o tulpină de *Bacillus subtilis* a fost modificată genetic prin introducerea de copii multiple ale operonului *rib*. Genele responsabile de sinteza riboflavinei au fost amplificate, înlocuindu-se promotorul de tip sălbatic cu un promotor puternic de la bacteriofagul SPO1. Această tulpină produce riboflavină cu un randament de până la 15 g/L;

- Tulpina superproducătoare de *Corynebacterium ammoniagenes* a fost obţinută prin inserarea unui promotor puternic pentru a accentua exprimarea genelor responsabile de biosinteza riboflavinei în mediu minimal şi prin accentuarea exprimării genelor ce codifică două enzime implicate în sinteza riboflavinei, GTP ciclohidrolaza II şi riboflavin-sintetaza, reuşindu-se un randament de producţie de 15 g/L;

- Tulpina *Lactococcus lactis* producătoare de acid folic și riboflavină a fost obţinută prin mutageneză directă și inginerie metabolică. În acest sens, tulpina *Lactococcus lactis* CB010, rezistentă la roseoflavină (analog al riboflavinei), are un metabolism denaturat al vitaminei B2, producând riboflavina în loc să o consume. Această tulpină a fost transformată cu plasmida pNZ7010 care exprimă gena *folKE*, ceea ce a condus la o creştere de de 10 ori a nivelului de acid folic extracelular şi o productivitate pentru riboflavină de 24 mg/L.

Biosinteza riboflavinei. *A. gossypii* și *B. subtilis* sintetizează riboflavina în mod similar, pornind de la doi precursori importanți: 5-ribulozo-fosfatul derivat din calea pentozofosfatului și trifosfatul de guanozină ce provine din biosinteza purinei. Ulterior, riboflavina este produsă în urma a şapte transformări enzimatice succesive, care se derulează diferit la cele două microorganisme. La *B. subtilis*, calea biosintezei este codificată de operonul *rib* ce conţine cinci gene (*ribDG, ribE, ribAB, ribH, ribT*). La *A. gossypii*, cele şase gene responsabile de biosinteza riboflavinei (*RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5, RIB7*) nu sunt grupate.

Tehnologia obţinerii vitaminei B2. Obţinerea prin biosinteză a vitaminei B2 se realizează pe o linie tehnologică caracteristică produselor de biosinteză şi include următoarele etape: sterilizarea aerului şi a mediului de cultură, fermentaţia, separarea vitaminei din biomasă şi purificarea ei. Procesul de biosinteză a vitaminei B2 este foarte sensibil la toţi factorii ce intervin în timpul unui ciclu de fermentaţie. Microorganismele producătoare de riboflavină sunt foarte sensibile şi susceptibile la mutaţii, utilizarea tulpinii pure este esenţială. De asemenea, există permanent pericolul infecţiilor, iar menţinerea sterilităţii este foarte importantă.

Pentru stimularea productivităţii fermentaţiei cu *A. gossypii* se utilizează mediul de cultură bogat în uleiuri vegetale, iar cultura este supusă stresului oxidativ. *B. subtilis* sintetizează riboflavina utilizând glucoza ca sursă de carbon. Sursa de azot este reprezentată de făină de soia sau extract apos de porumb. Glicina şi purinele (xantina, hipoxantina) au rolul de precursori, suplimentarea lor în mediul de cultură mărind randamentul cu 40%. Pentru cultura fungică, pH-ul optim este în domeniul 6,5-8 iar temperatura de 28-30ºC, iar pentru cea bacteriană pH-ul optim este în domeniul 6,5-7,5 iar temperatura de 30-40ºC. Fermentaţia se realizează prin procedeul culturii în profunzime, oferind randament mare, economie de spaţiu, iar produsul obţinut este omogen şi de calitate. Dinamica principalilor parametri în biosinteza industrială a riboflavinei este tipică pentru un metabolism endocelular. Procesul de fermentaţie cu *A. gossipyi* se desfăşoară în patru faze:

1. În prima fază, care durează circa 25 de ore, are loc un consum accentuat al sursei de carbon şi o scădere de pH a cărui valoare, dacă nu e corectată, ajunge la 5-5,5. În trofofază nu se elaborează vitamina B2, dar are loc o acumulare de biomasă;
2. În faza a doua continuă reducerea conţinutului de lipide şi scăderea pH-ului, iar în biomasă se formează spori. Sporularea marchează începutul idiofazei şi declanşează formarea metaboliţilor secundari, inclusiv a riboflavinei. Durata acestei faze este de 20-25 de ore;
3. În faza a treia, care durează aproximativ 100 de ore, resursa de carbon este metabolizată complet, pH-ul începe să crească continuu, necesitând corectarea cu acizi pentru menţinerea valorii optime. În acest stadiu numit fază de producţie, se formează cantitatea cea mai mare de vitamină B2. Riboflavina apare la început ca metabolit intracelular, apoi se repartizează între miceliu şi mediul apos, iar în final este deplasată preferenţial în soluţia apoasă;
4. În faza a patra a fermentaţiei, acumularea de riboflavină încetează şi începe un proces accentuat de autoliză a miceliului, caracterizat prin creşterea bruscă a pH-ului. Această etapă trebuie evitată, deoarece începe şi degradarea produsului biosintetizat.

Pentru industria farmaceutică, produsul biosintetizat trebuie separat din mediul de cultură, concentrat şi înalt purificat. În urma fermentaţiei, având o solubilitate scăzută, o mare parte din produs este deja cristalizat. După coagulare prin acidulare şi încălzire la 70ºC, biomasa se decantează, se filtrează la 20ºC, iar filtratul trece la separare. Separarea vitaminei B2 din soluţia nativă se poate realiza prin mai multe procedee: reducerea chimică la dihidroriboflavină şi reoxidare; reducere şi reoxidare biologică; extracţie cu solvenţi organici; separare cu schimbători de ioni. Purificarea se realizează prin recristalizare (Schwechheimer şi colab. 2016).

Cea mai mare parte din vitamina B2 obţinută prin biosinteză este folosită în industria alimentară, în prepararea concentratelor alimentare (lapte condensat, sucuri concentrate), în prepararea unor produse farmaceutice (complex de vitamine B) cu acţiune revitalizantă folosite în surmenare şi convalescenţă. Vitamina B2 este, de asemenea, utilizată cu succes în tratarea migrenei și a malariei.

7.3.2. Biotehnologia obţinerii cobalaminei (vitamina B12)

Vitamina B12 desemnează compușii grupului cobalamină. Formele naturale sunt adenozilcobalamina, metilcobalamina și hidroxicobalamina. Cianocobalamina este o formă de cobalamină stabilă produsă industrial, care nu se găsește în natură. Cobalaminele au o structură asemănătoare hemoglobinei, fiind formate dintr-un macrociclu porfirinic centrat pe un atom de

cobalt, de care se leagă o grupare de tip adenozinic şi o grupare CN pentru cianocobalamină, OH pentru hidroxicobalamină sau CH pentru metilcobalamină (**Figura 37**).

Deşi anemia pernicioasă a fost descrisă încă din secolul XIX şi identificarea ficatului ca sursă a compusului antianemic a fost intuită la începutul secolului XX, vitamina B12 a fost izolată în stare pură abia în anul 1948, de către două echipe independente de cercetători. Structura moleculei a fost stabilită ulterior cu ajutorul difracţiei cu raze X. Vitamina B12 derivă de la un sistem macrociclic numit corină, care conţine patru atomi de azot incluşi în cele patru nuclee pirolice. Molecula vitaminei B12 este formată din două porţiuni: partea nucleotidică conţinând restul 5,6-dimetil-benzimidazol, riboza şi acidul fosforic, şi porţiunea ce conţine sistemul macrociclic şi ionul de cobalt.

Cobalamina reprezintă tratamentul de bază al anemiei pernicioase şi a altor tipuri de anemii. Este deosebit de importantă pentru funcționarea normală a sistemului nervos, prin rolul său în sinteza mielinei. Este indispensabilă sintezei ADN-ului, absenţa sa având consecinţe importante, îndeosebi asupra ţesuturilor cu diviziune celulară rapidă, ca măduva osoasă, antrenând o diminuare a neutrofilelor şi a trombocitelor, precum şi apariţia megaloblastelor.

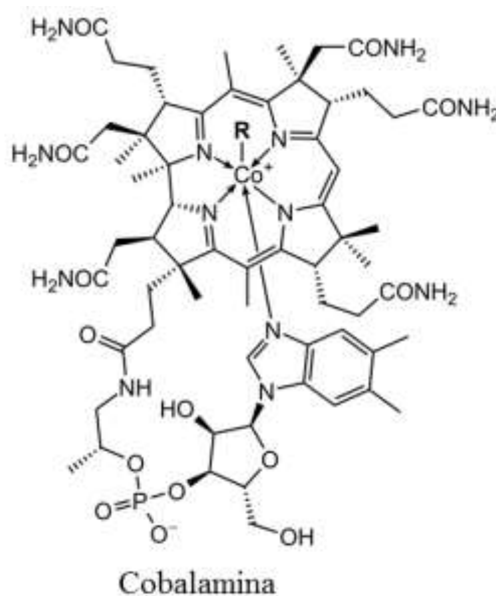


Figura 37. Structura vitaminei B12.

Sursele principale de vitamină B12 sunt endogene (bacteriile intestinale) şi exogene (aport alimentar de proteine animale). Vitamina B12 se găseşte în ficatul animalelor, în nămolul activ al staţiilor de epurare şi în culturi microbiene. Prin sinteză chimică s-au obţinut cantităţi reduse de cobalamină, cu preţ de cost ridicat, procesul complex implicând peste 70 de etape. De aceea se preferă producţia pe cale biosintetică cu ajutorul microorganismelor.

Biotehnologic, cobalamina se obţine cu ajutorul bacteriilor *Propionibacterium freudenreichii, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas denitrificans* şi altele, cu tulpini obţinute prin mutageneză sau tulpini recombinate. Un organism himeric denumit *Rhodopseudomonas protamicus* a fost creat prin fuzionarea protoplaştilor de *Protaminobacter ruber* şi *Rhodopseudomonas spheroides* (Martens şi colab. 2002). Cercetările au fost iniţial axate pe strategii convenţionale de mutageneză şi optimizare a procesului fermentativ, însă ulterior ingineria metabolică a condus către transformarea tulpinilor bacteriene. Recent, *E. coli* este studiată ca

platformă de producţie a cobalaminei. Bacteria *E. coli* a pierdut în decursul evoluţiei calea de biosinteză *de novo* a cobalaminei, însă exprimarea heterologă a acestei vitamine a fost demonstrată, deşi cu o productivitate scăzută (Fang şi colab. 2017).

Vitamina B12 utilizată în industria alimentară pentru fortificarea alimentelor este obţinută cu ajutorul bacteriilor *Propionibacterium* sp., acestea fiind recunoscute ca microorganisme sigure (GRAS). Aventis, liderul producţiei de vitamină B12 pentru industria farmaceutică, utilizează tulpini de *P. denitrificans*, în ciuda faptului că această bacterie nu face parte din lista speciilor GRAS (Piwowarek şi colab. 2018).

Biosinteza cobalaminei. Cobalamina este sintetizată prin două mecanisme: aerob (cale codificată de gene *cob* prezente la bacteriile din genul *Pseudomonas*) și anaerob (cale codificată de gene *cbi* identificate la genurile *Bacillus* și *Salmonella*). Bacteriile din genul *Propionibacterium* au nevoie atât de condiții anaerobe, cât și de condiții aerobe pentru a produce în mod eficient vitamina B12, genomul acestor lor deţinând atât gene *cbi* cât și *cob*. În calea de biosinteză a cobalaminei se disting două etape fundamentale: formarea ciclului cobirinic şi încorporarea restului nucleotidic.

Tehnologia obţinerii vitaminei B12. Fabricarea industrială a vitaminei B12 prin biosinteză cuprinde următoarele procese tehnologice: sterilizarea echipamentului, a aerului şi a mediului de cultură, fermentaţia propriu-zisă, separarea, purificarea şi cristalizarea vitaminei B12. Procesul de biosinteză este influenţat de tulpina utilizată, temperatură, pH, compoziţia mediului de cultură, gradul de aerare, prezenţa precursorilor şi este dirijată în funcţie de cerinţele microorganismului producător.

Pentru producţia cu *Propionibacterium* sp. se utilizează un mediu de cultură bogat în aminoacizi esenţiali, săruri de cobalt, dimetilbenzimidazol, zaharuri. Procesul se derulează în trei etape:

1. În faza de prefermentare are loc creşterea biomasei şi formarea acidului aminolevulinic. În absenţa ionilor de Co^{2+} se formează porfirine, iar la concentraţii suficiente de Co^{2+}, acidul aminolevulinic nu mai trece în mediu, ci se transformă în acid cobirinic în interiorul celulelor;
2. În prima fază a fermentaţiei propriu-zise, celulele bacteriene trebuie cultivate în condiții anaerobe câteva zile, pentru a genera precursorul vitaminei B12, acidul cobirinic;
3. A doua fază de fermentaţie se desfăşoară în condiţii aerobe, având loc biosinteza cobalaminei prin sintetizarea liganzilor și conjugarea cu cobinamida.

Biosinteza are loc la 30ºC, în condiţii de aerare minimă şi la pH neutru şi durează aproximativ 70-120 de ore, până la epuizarea surselor de carbon. Se lucrează cu glucoză sau zaharoză (sursa de carbon şi energie), extract de porumb sau făină de soia în cantităţi mari (sursa de azot), autolizat de drojdii (sursa de vitamine şi azot) şi hidrolizat de cazeină (sursa de aminoacizi). Creşterea biomasei este stimulată de biotină de anumiţi aminoacizi: glicină, serină, valină, acid aspartic. Problema majoră în producția de vitamina B12 folosind *Propionibacterium* sp. este inhibarea creșterii celulei datorită acumulării de metaboliți inhibitori cum ar fi acidul propionic și acidul acetic. Prin urmare, este necesar să se îndepărteze aceşti acizi generaţi în timpul fermentației, prin alcalinizarea mediului, filtrarea în flux încrucișat, fermentaţia cu purificare pe coloană cu cărbune activ, fermentaţie cuplată cu extracţie, electrodializă sau prin imobilizarea celulelor bacteriene. Pentru a menține o producție eficientă, mediile de cultură trebuie suplimentate cu precursori importanți în

timpul biosintezei vitaminei B12, cum ar fi ionii de cobalt ce constituie compusul central al moleculei şi dimetilbenzimidazolul, gruparea responsabilă de acţiunea terapeutică a moleculei. Introducerea clorurii de cobalt se face de la începutul procesului, iar benzimidazolul se introduce după 50-60 de ore. Se mai suplimentează cu glicină, treonină, acid 5-aminolevulinic, betaină (melasă de sfeclă) și colină, indiferent de tulpinile de producție utilizate (Piwowarek şi colab. 2018).

Cobalamina este conţinută în biomasă. După coagularea termică, cu electrolit sau bazică, se filtrează amestecul de fermentaţie şi se obţine un prim concentrat din biomasă. Biomasa filtrată se tratează la 90-95ºC cu acid azotos, când se pune în libertate cobalamina din complecşii proteici. Vitamina eliberată se transformă, sub acţiunea acidului azotos, în nitrozocobalamină, mai stabilă. Se filtrează, se spală pe filtru cu apă caldă (85-95ºC). După reunirea filtratului cu apa de spălare se salefiază cu NaCl şi se filtrează din nou, apoi se trimite la extracţie.

Pentru izolarea vitaminei B12 se foloseşte cel mai mult metoda extracţiei selective. Din faza apoasă se extrage apa şi cobalamina cu un amestec butanol:fenol = 1:1. Extractul organic ce conţine vitamina B12 se tratează cu apă (raport 20:1) când vitamina se reextrage din solvent în apă. Soluţia apoasă obţinută după separarea fazelor, se tratează cu NaCN la pH 7,5-8, obţinându-se cobalamina care se supune purificării. Purificarea constă în extracţie cu solvent organic şi metode cromatografice, concentrare sub vid şi cristalizare. Productivitatea tulpinilor industriale ajunge la peste 200 mg/L (Martens şi colab. 2002).

Pentru producţia cu *Pseudomonas denitrificans* se utilizează un mediu de cultură pe bază de sirop de maltoză, extract apos de porumb şi betaină, suplimentat cu săruri minerale, clorură de cobalt şi dimetilbenzimidazol, la un pH de 7,2-7,4. Trofofaza are loc la 28ºC, timp de 70 de ore, cultura fiind aerată şi agitată. Idiofaza are loc la 32ºC, iar biosinteza se încheie după 180 de ore. Optimizarea procesului a permis obţinerea vitaminei B12 cu un randament de circa 200 mg/L (Xia şi colab. 2015). Avantajele obţinerii cobalaminei în sistemul bacterian constau în derularea procesului într-o singură etapă, în condiţii aerobe, o durată mai scăzută şi costuri mai reduse cu extracţia şi purificarea compusului.

8. BIOTEHNOLOGII PENTRU OBŢINEREA VACCINURILOR

Vaccinurile sunt produse antigenice derivate dintr-un agent patogen specific sau puternic înrudit cu acesta, administrate omului sau animalelor pentru a proteja împotriva unor boli infecţioase sau oncologice. Vaccinul este un **produs biologic** destinat creşterii imunităţii organismului, şi poate fi utilizat în scop profilactic sau terapeutic. Vaccinul ideal poate fi definit a fi acela care conţine o substanţă puternic antigenică, cu eficacitate totală, ce determină o protecţie postvaccinală puternică şi durabilă, chiar pentru toată viaţa, la 100% dintre receptori, într-o singură inoculare, fără să producă reacţii adverse, este stabil în diferite condiţii, uşor de administrat, disponibil cantitativ şi ieftin. Niciun vaccin nu este 100% sigur sau 100% eficient, însă, în istoria omenirii, imunizarea prin vaccinare ocupă locul II în reducerea mortalităţii şi creşterea populaţiei umane, după apa potabilă.

Istoricul vaccinării. Cu toate că variolizarea ca metodă era aplicată din cele mai vechi timpuri în India şi Egipt, Edward Jenner a descoperit primul vaccin împotriva variolei în 1796. Tehnica variolizării a constat în inocularea cu material variolizant reprezentat de secreţii recoltate din pustule ale unor vaci infectate cu virusul vaccinei (*cowpox*), pentru imunizarea împotriva variolei (*smallpox*). Jenner a descris principiul vaccinării şi a contribuit la eradicarea variolei, fiind considerat părintele imunologiei. El este considerat omul care a salvat cele mai multe vieţi.

Louis Pasteur a inaugurat era luptei împotriva bolilor infecţioase şi a prevenirii lor prin vaccinare cu microorganisme atenuate. În anul 1885 a vaccinat cu succes contra turbării un copil de nouă ani. Între 1885-1888 a vaccinat peste 5.000 de persoane, rata mortalităţii fiind mai mică de 1%, ceea ce a demonstrat eficienţa metodei. O istorie punctată a vaccinării, dar şi a mecanismelor de acţiune şi a metodelor ştiinţifice este disponibilă pe site-ul Colegiului Medicilor din Philadelphia, SUA (https://www.historyofvaccines.org/timeline/all). Scăderea semnificativă a deceselor cauzate de bolile infecțioase și neinfecțioase prin dezvoltarea vaccinurilor a avut un impact uriaș asupra sănătății publice. În secolul XX au apărut o nouă și diversă gamă de vaccinuri profilactice și terapeutice. Agenţii patogeni şi vaccinarea au primit o atenție specială în aspecte de biosecuritate şi bioterorism. Un enorm efort este depus în prezent pentru a crește eficiența și performanța vaccinurilor și pentru a reduce riscurile asociate vaccinării. În ciuda dezvoltării unor vaccinuri avansate și eficiente în ultimele decenii, sunt necesare noi mecanisme de prevenire a bolilor epidemice și pandemice. Cronologia vaccinurilor este prezentată în **Tabelul 7**. În prezent, dezvoltarea vaccinurilor nu ţinteşte doar boli infecţioase, ci şi diferite tipuri de cancer dar şi abuzul de droguri, alergiile, diabetul, boala Alzehimer.

Prima generație de vaccinuri, denumite şi tradiţionale, sunt cele atenuate şi inactivate, care utilizează o metodă primară în producția lor. Organismele infecţioase în sine, agenții patogeni atenuați sau toxine bacteriene inactivate, care sunt efectiv imunogene, sunt folosite la fabricarea acestor vaccinuri. Avantajele acestor tipuri de vaccinuri se datorează capacității lor ridicate de a stimula imunitatea înnăscută, inducerii protecției pe termen lung, producției ușoare cu costuri rezonabile. Cu toate acestea, există unele dezavantaje, cum ar fi riscul de inducere a bolii datorită

utilizării agentului patogen complet (viu sau inactivat) și a virulenței recursive a agentului patogen în corpul gazdei.

Vaccinurile din generația a doua sunt cele subunitare, conjugate și recombinate. Acestea rezolvă unele neajunsuri asociate vaccinurilor de primă generaţie prin utilizarea unor elemente precum proteine recombinate sau sintetice, antigene neproteice și molecule imunogene exprimate de bacterii sau virusuri. Printre dezavantajele acestor vaccinuri se numără specificitatea tulpinii utilizate, asocierea potențială cu riscuri de interferență virală și imunitate încrucișată și reacţiile alergice la unele grupuri de pacienți. Vaccinurile bazate pe proteine virale tind să provoace răspunsuri imune care sunt limitate la răspunsul celulelor T CD4+ sau mecanisme dependente de anticorpi, fără a genera răspunsul limfocitelor T CD8+.

Vaccinurile de generația a treia, cunoscute sub numele de vaccinuri genetice, presupun administrarea directă a ADN sau ARN. Vaccinurile ADN conţin într-o plasmidă potențial imunogenă gena ce codifică antigenul. Vaccinurile ADN au multe avantaje: nu prezintă risc de infecție, oferă o imunitate durabilă, nu generează răspuns imun la vectori sau celule transfectate şi au o mare stabilitate, unele nu necesită refrigerare. Proteinele exprimate, care sunt în formă naturală, stimulează pe diferite căi imunitatea celulară, umorală şi mucozală. Riscurile vaccinurilor ADN vizează transfecţia celulelor neţintă, dezvoltarea toleranţei, a tumorilor ori a bolilor autoimune (Tahamtan şi colab. 2017). O abordare revoluţionară o constituie vaccinurile bazate pe ARNm, care au mai puţine dintre aceste dezavantaje, însă sunt mai instabile, ARNm fiind uşor degradabil.

În prezent, **dezvoltarea vaccinurilor de ultimă generaţie** presupune vaccinologia inversă, structurală şi sintetică. Prin combinarea cunoştinţelor şi tehnicilor de imunologie umană, biologie structurală şi bioinformatică, epitopii antigenici sunt identificați pe baza secvențelor de aminoacizi și a structurilor secundare și terțiare rezultate. Principiul se bazează pe observația că un răspuns imun eficient nu necesită recunoașterea întregii proteine antigenice, ci doar recunoașterea unor epitopi. De asemenea, perspectivele se îndreaptă către noi moduri de administrare, mai puţin invazive, şi către descoperirea unor noi adjuvanţi ce ar putea îmbunătăţi sustenabilitatea producerii de anticorpi la diferite categorii de vârstă (Finco şi Rappuoli 2014).

Tabel 7. Cronologia dezvoltării vaccinurilor.

Primul vaccin *aprobat	Maladia	Agent etiologic	Descoperit de / Producător	Tipul vaccinului actual	Epidemiologie – situaţia actuală a îmbolnăvirilor
1796 1903*	Variola	*Variola major* *Variola minor*	Edward Jenner Miles Inc.	Vaccin viu atenuat, nu mai este disponibil	Eradicată
1879	Holera aviară	*Pasteurella multocida*	Louis Pasteur	Vaccin mixt inactivat împotriva pestei şi holerei aviare (uz veterinar)	Apare şi la mamifere În sezonul rece şi umed
1885 1917*	Holera	*Vibrio cholerae*	Jaume Ferran i Clua Eli Lilly & Co.	Oral inactivat şi viu atenuat Injectabil în zonele cu risc crescut	Ţările în curs de dezvoltare: Tanzania, Somalia, Yemen, Algeria, Zimbabwe
1885 1915*	Rabia	*Rabies virus*	Louis Pasteur şi Émile Roux Eli Lilly & Co.	Oral viu modificat (uz veterinar) Injectabil inactivat (profilactic şi post-expunere)	Accidental la oameni muşcaţi de animale bolnave domestice ori sălbatice

Primul vaccin *aprobat	**Maladia**	**Agent etiologic**	**Descoperit de / Producător**	**Tipul vaccinului actual**	**Epidemiologie – situaţia actuală a îmbolnăvirilor**
1888 1903* 1923 1928*	Difteria	*Corynebacterium diphtheriae*	Emil von Behring Paul Ehrlich Parke-Davies & Co. Gaston Ramon, Thomas Glenny Connaught Laboratories	Vaccin cu anatoxine (acelular, componente): Diftero-tetanic-pertussis-acelular (dTPa) și diftero-tetanic (dT)	Focare: 2017 Venezuela (300), Indonezia (600) Cazuri izolate după 2010: Haiti după tsunami; India, Spania, Belgia, Malaezia, Scoţia, Grecia la copii nevaccinaţi
1896 1914*	Febra tifoidă	*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serovar Typhi	Almroth Edward Wright	Oral viu atenuat Parenteral subunitar din capsula polizaharidică (ViCPS) Parenteral conjugat (Vi-TT)	2005 Congo Din 2016 focar XDR în Pakistan
1897	Ciuma	*Yersinia pestis*	Alexandre Yersin	Vechiul vaccin cu celule omorâte nu mai este disponibil În dezvoltare: viu atenuat, subunitar, recombinat	Focare izolate: 2014 China; 2017 Congo, Madagascar, Chile; 2019-2020 China, SUA
1914 1933*	Tetanosul	*Clostridium tetani*	Emil von Behring Shibasaburo Kitasato Merck & Co.	Vaccin cu anatoxine (acelular, componente): DTP, DT, TT sau dT	2019: 14.751 cazuri 2018: 6 cazuri în România
1914* 1949*	Tusea convulsivă	*Bordetella pertussis*	Pearl Kendrick şi Grace Eldering Lederle labs, Merrel National, Miles Inc	Vaccin acelular cu antigene de suprafaţă, flagelare etc. DTP tri-, tetra-, penta-, hexavalent	Epidemii anuale 2018: 35.627 cazuri în UE; 2019: 110 cazuri în România
1921	Tuberculoza	*Mycobacterium tuberculosis*	Albert Calmette Camille Guérin	Intradermal viu atenuat (BCG) În dezvoltare: subunitar (şi împotriva *M. leprae*), recombinat, nazal, aerosoli	2017: 275.000 noi îmbolnăviri în UE; 2019: 10 mil. noi cazuri global
1926	Scarlatina	*Streptococcus pyogenes*	Gladys H. Dick şi George F. Dick	Vechiul ser cu antitoxină nu mai este disponibil	Boală comună 2018: 1.921 cazuri în România
1932 1953*	Febra galbenă	*Flavivirus*	Max Theiler Merrel Laboratoires	Vaccin cu virus viu atenuat	Africa, Asia, America de Sud
1935	Antraxul	*Bacillus anthracis*	Max Sterne	Vaccin inactivat acelular	2007, 2009 SUA; 2008, 2009 Anglia; 2018: 1 caz în România
1937 1952*	Tifosul	*Rickettsia*	Rudolf Weigl Wyeth	Nu mai este disponibil	Încă neeradicată 2018 SUA
1941*	Encefalita transmisă de căpuşe	*Flavivirus*	Mikhail Chumakov Pfizer, GSK	TBE inactivat	10-12.000 cazuri pe an raportate global
1942 1945*	Gripa	*Orthomyxoviridae* virus gripal tip A, B, C	Thomas Francis Jonas Salk, Connaught Lab, Lederle Lab, Merck & Co.	Nazal viu atenuat Injectabil subunitar tetravalent	Epidemii sezoniere Risc pandemic

Primul vaccin *aprobat	**Maladia**	**Agent etiologic**	**Descoperit de / Producător**	**Tipul vaccinului actual**	**Epidemiologie – situaţia actuală a îmbolnăvirilor**
1948 1955* 1961*	Poliomielita	*Enterovirus C* subtip *Poliovirus*	Hilary Koprowski Jonas Salk (IPV) Merck & Co., Parke Davies Albert Sabin (OPV), Pfizer	Vaccin inactivat injectabil (IPV) Vaccin atenuat oral (OPV)	99.9% eradicată Eradicată în România
1963*	Rujeola (Pojarul)	*Morbillivirus* sp.	Thomas Peebles John Enders Merck & Co.	Vaccin viu atenuat Vaccin subunitar Combinat: ROR	Focare 2019: 3.900 cazuri în România
1967*	Parotidita epidemică (Oreionul)	*Rubulavirus* sp.	Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin viu atenuat subcutanat Combinat: ROR	Focare 2019: 110 cazuri în România
1969* 1971*	Rubeola	*Rubivirus* sp.	Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin viu atenuat subcutanat Combinat: ROR	Încă neeradicată 2019: 10 cazuri în România
1974 1995*	Varicela	*Varicellovirus* sp.	Michiaki Takahashi Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin viu atenuat subcutanat	Zona temperată 2018: 31.942 cazuri în România
1977*	Pneumonia streptococică	*Streptococcus pneumoniae*	Robert Austrian Merck & Co.	Vaccin polizaharidic conjugat 10-valent, 15-valent, 20-valent	Global
1974*	Meningita	*Neisseria meningitidis*	Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin tetravalent conjugat	Global 2018: 77 cazuri în România
1981* 1986*	Hepatita B	*Orthohepadnavirus* sp.	Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin recombinat	Ţări în curs de dezvoltare 2018: 241 cazuri în România (B+C)
1985* 1987*	Infecţia cu Hib	*Haemophilus influenzae* (Hib)	Porter Anderson şi David Smith Connaught Lab, Pfizer, Lederle Lab John Robbins şi Rachel Schneerson (conjugat) Connaught Lab	Vaccin conjugat cu proteine meningococale	Global
1995* 1996*	Hepatita A	*Hepatovirus* sp.	Maurice Hilleman Merck & Co.	Vaccin inactivat	Ţări în curs de dezvoltare 2018: 4.562 cazuri în România
1998*	Gastroenterita şi diareea severă	*Rotavirus* sp.	Wyeth	Vaccin viu atenuat oral	Global
1998*	Boala Lyme (borelioza)	*Borellia* sp.	SmithKline Beecham	Vaccin recombinat, nu mai este produs, cerere insuficientă În dezvoltare: subunitar	Europa, America de Nord 2018: 532 cazuri în România
2000*	Febra hemoragică cu sindrom renal	Hantavirusuri	Korea Green Cross	Vaccin inactivat, Coreea de Sud, nu acoperă tulpinile europene	2018: 1.826 cazuri în Europa 2018: 1 caz în România
2006*	Cancerul cervical	Papilomavirus uman (HPV)	Merck & Co., GSK	Vaccin recombinat	Global
2008*	Zona zoster	Virus varicelo-zosterian	Merck & Co., GSK	Vaccin viu atenuat subcutanat	Global

Primul vaccin *aprobat	Maladia	Agent etiologic	Descoperit de / Producător	Tipul vaccinului actual	Epidemiologie – situaţia actuală a îmbolnăvirilor
2008*	Cancerul renal, melanom şi gliom	-	Antigenics Inc.	Vaccin terapeutic personalizat	Global
2009*	Encefalita japoneză	Virusul encefalitei japoneze	Valneva Scotland ltd	Viu atenuat, inactivat şi recombinat	Asia
2010*	Cancerul de prostată	-	Dendreon Pharmaceuticals	Vaccin terapeutic personalizat	Global
2011*	Cancerul pulmonar cu celule non-mici	-	Center of Molecular Immunology, Cuba	Vaccin terapeutic recombinat, EGF conjugat	Global
2013*	Boala gură-mână-picior	Coxsackievirus A16, Enterovirus 71	Sinovac	Vaccin inactivat În dezvoltare: viu atenuat, recombinat	Boală emergentă
2016*	Febra galbenă	Virusul febrei galbene	Sanofi Pasteur	Vaccin viu atenuat	Asia, Africa, America de Sud 2018: 1 caz în România
2016*	Lepra	*Mycobacterium leprae*	Cadila Pharmaceuticals	Vaccin inactivat (*M. indicus pranii*), India	Ţările în curs de dezvoltare: India, Brazilia, Indonezia etc
2018*	Febra Dengue	Virus Dengue	Sanofi Pasteur	Vaccin viu atenuat recombinat himeric În dezvoltare: subunitar, vaccin ADN	Zone tropicale
2019* 2020*	Ebola	*Ebolavirus* sp.	Merck & Co Janssen Pharmaceuticals	Vaccin recombinat cu vector viral capabil de replicare În dezvoltare: viu atenuat, recombinat, nazal, tablete orale	Africa Subsahariană 2014-2016 SUA, Marea Britanie, Italia, Spania
2020*	COVID-19	SARS-CoV-2	Moderna, Pfizer & BioNTech	Vaccin cu ARNm	Pandemie din 2020

8.1. Principiul de acţiune al vaccinurilor

Vaccinurile acţionează în acelaşi mod cu agenţii patogeni, sau cu un component al acestora care are capacitate imunogenă, adică stimulează răspunsul imun al organismului pentru producerea de anticorpi specifici împotriva agentului patogen. **Imunogenitatea, eficacitatea şi siguranţa vaccinului sunt cuantificate în studii clinice randomizate, controlate, de preferință dublu-oarbe.**

În dezvoltarea vaccinurilor, **imunogenitatea** este în centrul eficienței vaccinului, fiind urmărită prin determinarea nivelului anticorpilor specifici în sânge. Imunogenitatea reprezintă capacitatea unui antigen sau epitop de a provoca un răspuns imun în corpul uman sau animal, respectiv capacitatea de a induce un răspuns imun, mediat umoral și / sau celular. Durata persistenţei anticorpilor în serul sangvin după imunizarea activă naturală (trecerea prin boală) sau artificială (vaccinare) este produsul unui echilibru între sinteza imunoglobulinelor şi rata de metabolizare a acestora. În cazul unor terapii poate să apară imunogenitatea nedorită ca răspuns

imun al organismului împotriva unui antigen terapeutic (ex. proteină recombinată sau anticorp monoclonal). Această reacție duce la producerea de anticorpi anti-medicament, inactivând efectele terapeutice ale tratamentului și, în cazuri rare, inducând efecte adverse.

Eficacitatea vaccinului este definită ca reducerea incidenței unei boli în rândul persoanelor care au primit vaccinul, comparativ cu incidenţa la subiecţii nevaccinaţi sau care au primit placebo. Eficacitatea unui nou vaccin este evaluată în faza II sau III a studiilor clinice.

Siguranţa pacienţilor este atent monitorizată pe tot parcursul cercetării clinice. În cazul oricărui tratament medical există un potențial de apariţie a reacţiilor adverse şi chiar a unor complicaţii grave, denumite reacţii adverse severe. Spre deosebire de cele mai multe alte intervenții medicale, vaccinurile sunt administrate de regulă pacienţilor sănătoși și astfel este de așteptat un nivel mai ridicat de tolerabilitate şi implicit de siguranță. Apariţia unor reacţii adverse la vaccinare este posibilă, însă acestea sunt mult mai puţin frecvente decât riscurile asociate bolilor pe care le împiedică. Mai multe informații despre raportarea efectelor secundare suspectate se găsesc în informațiile de prescriere, în prospect sau în baza europeană de date privind rapoartele despre reacțiile adverse suspectate la medicamente. În sistemul de farmacovigilenţă pacienții, cadrele medicale și companiile farmaceutice trebuie să raporteze toate efectele secundare suspectate la autoritatea de reglementare a medicamentelor din țara lor. În România, ANMDM oferă opţiunea de raportare directă a reacţiilor adverse.

8.1.1. Bazele imunologice ale vaccinării

Apărarea organismului se face pe două căi:

A. Apărarea nespecifică realizată de către fagocite (în special macrofage, monocite, neutrofile, celule dendridice), care înglobează şi digeră agentul infecţios, cu ajutorul lizosomilor din celulă şi a unor enzime specifice;

B. Apărarea specifică bazată pe recunoaşterea specifică de către diferite tipuri de leucocite a substanţelor străine (*non-self*) numite antigene.

Există două tipuri de imunitate:

A. Imunitatea mediată umoral: este realizată de limfocite B (timus independente), ce sintetizează anticorpi specifici pentru marea varietate de antigene cu care vine organismul în contact;

B. Imunitatea mediată celular: este realizată de limfocite T (timus dependente), care recunosc şi distrug în mod specific purtătorii anumitor antigene (agenţi infecţioşi sau celule conţinând agenţi infecţioşi);

Dobândirea imunităţii se realizează:

A. Natural: în urma contactului sistemului imunitar cu antigenele:

- Prin îmbolnăvire;
- Prin prezenţa agenţilor patogeni, fără a cauza boală (infecţia inaparentă, asimptomatică).

B. Artificial: prin vaccinare-inocularea în organism a antigenelor, fie sub formă de toxine neutralizate, fie sub forma microorganismelor modificate astfel încât să îşi piardă patogenitatea dar să îşi păstreze antigenitatea.

Imunomodulatoarele sunt în cea mai mare parte constituenţi bacterieni sau virali ce declanşează evenimente multiple ale mecanismului imunologic, în principal modificări funcţionale

ale diverselor categorii de celule imunocompetente şi producţia de mediatori ai inflamaţiei. Aceste antigene activează sistemul imunitar înnăscut la nivel umoral (limfocite B) şi celular: celule epiteliale, celule endoteliale, granulocite (neutrofile, bazofile, eozinofile și mastocite), monocite, macrofage, celule *natural killer* (NK), celule dendritice, diverse tipuri de limfocite T. Principalele celule care intervin în răspunsul immunologic sunt celulele efectoare şi celulele cu memorie, însă mecanismul prin care unele celule devin efectoare şi altele celule cu memorie nu este pe deplin înţeles.

Celulele efectoare realizează diferite funcţii în decursul răspunsului imun: macrofagele fagocitează microorganismele, limfocitele T citolitice sau citotoxice omoară celulele gazdă infectate, limfocitele B diferenţiate şi plasmocitele secretă imunoglobuline, limfocitele T secretă citokine şi activează alte tipuri de celule.

Celulele cu memorie sunt populaţii de celule B şi T provenite din limfocite naive care au fost activate prin contactul cu un antigen specific. Părăsesc splina şi ganglionii limfatici, se adaugă stocului de limfocite recirculante şi pot patrula timp îndelungat pe traseul ganglioni limfatici – vase limfatice – sânge – ţesuturi. Se diferenţiază mai rapid la celule efectoare şi participă mai eficient la eliminarea antigenelor din organism.

Limfocitele provin din celulele stem pluripotente ale măduvei osoase şi se găsesc în sânge, limfă şi în organele limfatice. Se disting mai multe tipuri de limfocite. Celulele limfocitare din ganglionii şi nodulii limfatici, provenite din limfocitele naive aflate în stare de repaus sunt denumite limfoblaste. Stimularea de către antigene sau mitogeni conduce la proliferarea limfoblastelor (expansiune clonală) şi diferenţiere în limfocite B (secretoare de anticorpi), T (producătoare de citokine) sau celule cu memorie.

Limfocitele naive sunt limfocite B şi T mature (limfocite imunocompetente) care nu s-au întâlnit cu un antigen şi nu sunt descendente ale unor celule activate de antigen. Prezintă markeri de suprafaţă specifici limfocitelor mature. După contactul cu antigenul sunt activate şi se diferenţiază în celule efectoare: limfocite B sau diverse tipuri de limfocite T (citotoxice, helper, NK).

Limfocitele B au rol în secreţia anticorpilor şi în memorarea caracteristicilor imune ale agresorilor, pentru a-i recunoaşte în caz că repetă invazia. Anticorpii sunt secretaţi de limfocitele B şi descendenţii lor diferenţiaţi, plasmocitele, în număr de mii în fiecare secundă. Există un număr imens de subpopulaţii (clone) cu diferite specificităţi antigenice.

Limfocitele T secretă citokine care ajută la comunicarea şi cooperarea dintre celulele sistemului imun. Citokinele secretate de limfocite se numesc limfokine, şi cuprind o serie de interferoni, interleukine şi factori de stimulare a coloniilor. Există un număr imens de subpopulaţii cu diferite specificităţi antigenice, deoarece membrii unei clone exprimă un singur tip de receptor, cu aceeaşi specificitate. Unele dintre limfocitele T sunt citotoxice sau citolitice, având markeri fenotipici de suprafaţă (CD3+, CD4- şi CD8+), deoarece sintetizează proteine care formează pori în celulele infectate sau canceroase, distrugându-le. Alte limfocite T se numesc celule helper (CD3+, CD4+ şi CD8-), ajutând la creşterea eficienţei mecanismelor imune de apărare prin secreţia unor citokine ce induc proliferarea şi diferenţierea altor celule implicate în răspunsul imun. Limfocitele T supresoare moderează intensitatea răspunsului imun, iar cele amplificatoare îl intensifică. Limfocitele T-NK sunt o subpopulaţie mică de limfocite T, cele mai mari, ce exprimă receptori de

suprafaţă specifici celulelor NK (CD16). Ele acţionează rapid, prin secreţia atât de citokine cât şi de proteine care formează pori, distrugând substanţele străine care ajung în organism, celulele infectate sau celulele canceroase. Sunt foarte reactive la citokine şi au rol important în imunitatea mucoaselor.

Macrofagele se formează din celulele precursoare din măduva osoasă, monocitele. Acestea părăsesc circulaţia periferică şi migrează în ţesuturi, devenind macrofage tisulare în ganglionii limfatici, splină, măduvă osoasă, ţesut conjunctiv perivascular, cavităţi seroase precum peritoneul şi pleura, ţesut conjunctiv cutanat, plămân (macrofagul alveolar), ficat (celula Kupffer), os (osteoclastul), sistem nervos central (microglia) şi membrana sinovială (celule sinoviale de tip A). Au fost descrise celule cu o varietate de fenotipuri funcționale, inclusiv macrofage activate clasic (macrofage care mediază imunitatea gazdei și imunitatea antitumorală), macrofage activate alternativ (macrofage supresoare ce reglează vindecarea rănilor), macrofage de reglare (care secretă IL-10), macrofage asociate tumorilor (care suprimă imunitatea tumorală) și subsetul monocitic al celulelor supresoare derivate din linia mieloidă (funcțional similare cu macrofagele asociate tumorii).

Macrofagele poartă peste 30 de tipuri de receptori şi secretă peste 75 de substanţe biologic active (Zarnea şi Popescu 2011). Sistemul monocit-macrofag exprimă molecule specifice liniei (cum ar fi CD14), precum şi receptori de suprafaţă pentru un număr de molecule, incluzând regiunea Fc a IgG (CD16, CD32, CD64), componente ale complementului activat (CD35) şi variate citokine. Joacă un rol major în expresia reactivităţii imune prin medierea unor funcţii cum ar fi prezentarea antigenului către limfocitele T şi secreţia unor citokine, care sunt elementele centrale ale activării antigen-specifice a limfocitelor T şi B. Prezentarea antigenelor constituie o etapă esenţială pentru iniţierea răspunsului imun dobândit, celulele dendritice fiind cele mai potente şi eficiente. Macrofagele prezentatoare de antigene (exprimă proteina CD40) activează limfocitele T naive şi determină celulele B să producă anticorpi care ajută la opsonizarea antigenului (anticorpul afectează antigenul şi îl pregăteşte să fie fagocitat).

Macrofagele mediază funcţii efectorii cum ar fi distrugerea bacteriilor acoperite cu anticorpi, a celulelor tumorale sau chiar a celulelor hematopoietice normale în anumite tipuri de citopenii autoimune. De asemenea, macrofagele activate pot media activitatea litică antigen-nespecifică şi pot elimina celule tumorale în absenţa anticorpilor. Această activitate este larg mediată de citokine (cum ar fi factorul de necroză tumorală TNFα şi IL-l).

Produşii de secreţie ai macrofagelor sunt mai numeroşi decât ai oricărei alte celule a sistemului imun. Aceştia permit macrofagelor să îndeplinească atât funcţii proinflamatorii cât şi antiinflamatorii şi să regleze activitatea altor tipuri de celule. Printre produşii de secreție ai complexului monocite-macrofage se numără enzime hidrolitice, produşi ai metabolismului oxidativ, componenţi ai sistemului complement, TNFα, interferoni, interleukine şi citokine de chemotactism (chemokine) implicate în orchestrarea răspunsului imun în ţesuturi.

Mastocitele sunt celule mari, mononucleate, conjunctive, mobile, prezente în mod normal în cea mai mare parte a ţesuturilor din organismul uman, în special în jurul vaselor de sânge din ţesutul conjunctiv. Mastocitele sunt leucocite derivate din celule progenitoare hematopoietice. Acestea circulă în sânge într-o formă imatură înainte de a migra la nivelul ţesuturilor vascularizate, când sunt supuse diferențierii finale și maturării. Mastocitele se găsesc în special în organe aflate în

contact strâns cu mediul extern, cum ar fi pielea, căile respiratorii şi tubul digestiv, participând astfel la recunoașterea timpurie a agenților patogeni. Originea mastocitelor este o problemă încă neclarificată, existând mai multe ipoteze:

- unele mastocite tisulare ar fi leucocite bazofile, migrate din calea sanguină şi modificate morfo-funcţional sub acţiunea factorilor de mediu local datorită asemănărilor structurale între mastocitele din ţesuturile conjunctive moi şi bazofilele sanguine;
- mastocitele tisular s-ar diferenţia din aceeaşi clonă celulară din măduva hematogenă ca şi bazofilele sanguine;
- mastocitele se diferenţiază din celulele mezenchimale, la embrion şi la făt, iar la adult din celule mezenchimale perivasculare;
- mastocitele diferenţiate îşi păstrează capacitatea de proliferare prin autoreplicare, asigurând linia celulară mastocitară.

Activarea celulelor mastocitare conduce la o cascadă de reacţii. Receptorii de pe suprafaţa mastocitelor formează agregate mari cu anticorpii, care apoi sunt internalizate în vezicule acoperite. Răspunsul mastocitelor la moleculele semnal (hormoni, factori de creştere, mediatori imuni) depinde de densitatea şi distribuţia receptorilor plasmalemali. Toate mastocitele au în citoplasmă granule care conţin substanţe foarte active, şi care le conferă un rol foarte important în declanşarea şi întreţinerea unor reacţii imunologice şi inflamatorii.

Mastocitele au activitate enzimatică şi imunologică foarte variată. La om, mastocitele participă la reacţiile alergice de hipersensibilitate imediată (în astm, urticarie, alergie, şoc anafilactic). Mecanismul acţiunii mastocitelor: prezenţa antigenelor induce diferenţierea plasmocitelor, care sintetizează şi eliberează anticorpi specifici de tip IgE. Anticorpii IgE se fixează pe receptorii IgE de pe plasmalema mastocitelor. La un nou contact cu acelaşi tip de antigene, aceştia se vor cupla cu anticorpi IgE legaţi la plasmalema mastocitelor formându-se complexe antigen-anticorp care vor leza plasmalema, fiind eliminate un număr mare de granule mastocitare în matricea extracelulară. Substanţele din compoziţia granulelor determină fenomene clinice caracteristice reacţiilor de hipersensibilitate imediată: edem, durere, febră, stare de şoc, vasodilataţie, hipotensiune etc. Aceste fenomene clinice sunt determinate de substanţele sintetizate şi secretate de către mastocite. În reacţiile de apărare imunologică de tip imediat, s-a observat o scădere a numărului mastocitelor în ţesuturi, ca rezultat al reacţiilor masive antigen-anticorp. Anticorpii pot fi IgG sau IgM, sau activarea sistemului complement IgE. Creşterea numărului de mastocite în reacţiile de apărare imunologică de tip întârziat s-ar datora unei limfochine (MCGF - *mast cell growth factor*), produsă de către limfocitele T sensibilizate (Urb şi Sheppard 2012).

Celulele dendritice sunt celule accesorii derivate din măduva oaselor, ce se formează din celule Langherhans. Sunt înrudite cu sistemul fagocitar mononuclear. Prezintă prelungiri ramificate care formează o reţea complexă în centrii germinativi ai ganglionilor limfatici şi în foliculii limfoizi din diferite ţesuturi, fiind prezente în piele, sistem gastrointestinal şi respirator, în organe parenchimatoase. Celulele dendritice imature sunt localizate în epiteliul cutanat şi al mucoaselor, unde capturează agenţii patogeni, transportându-i în ganglionii limfatici, iar cele mature în ganglionii limfatici, unde prezintă antigenele celulelor T. Exprimă molecule ale complexului major de histocompatibilitate (MHC) clasa II (Zarnea şi Popescu 2011).

Capacitatea sistemului imunitar de a recunoaște moleculele specifice agenților patogeni se datorează parțial prezenței receptorilor imuni numiți receptori *Toll-like* (TLR) care sunt exprimați pe membranele leucocitelor (macrofage, celule dendritice, limfocite T-NK, T și B) și a celulelor neimune (celule epiteliale, endoteliale și fibroblaste). Agoniştii TLR sunt componente microbiene neproteice (lipopolizaharide, oligonucleotide, lipopeptide) sau proteice, ce activează receptorii marcând evenimentele moleculare care duc în cele din urmă la răspunsul imun înnăscut și la dezvoltarea imunității dobândite specifice antigenului.

8.1.2. Antigenele

Antigenele sunt substanţe *non-self,* care introduse în organismul uman declanşează din partea acestuia un răspuns imun, concretizat prin:

- Diferenţierea unor limfocite B, care vor produce anticorpi ce vor reacţiona specific cu antigenele (în imunitatea mediată umoral);
- Diferenţierea unor limfocite T, care vor recunoaşte specific şi vor reacţiona cu antigenele prezentate de propriile celule ale organismului (în imunitatea mediată celular).

Molecula imunogenă trebuie să nu fie recunoscută de sistemul imunitar ca aparţinând organismului respectiv, să ajungă în contact cu sistemul imunitar, deci să fie introdusă în organism pe cale parenterală sau prin leziuni ale mucoaselor interne şi să fie o proteină de cel puţin 10 kDa. Dacă este o glicoproteină capacitatea antigenică este mai mare. Alte macromolecule precum acizii nucleici, lipidele, polizaharidele singure nu sunt imunogene.

Anticorpii sunt substanţe secretate de limfocitele B mature, competente imunologic, ca răspuns la contactul cu un antigen, ce recunosc şi leagă specific antigenul respectiv. Sunt glicoproteine denumite şi **imunoglobuline.**

Structura imunoglobulinelor. Sunt molecule tetrapeptidice alcătuite din două lanţuri H (*heavy*) de 450 aminoacizi şi două lanţuri L (*light*), de 261 aminoacizi. La cele patru lanţuri peptidice se ataşează în diverse locuri resturi oligozaharidice. Atât lanţurile H cât şi cele L au o porţiune variabilă (VL şi VH) şi o porţiune constantă (CL şi CH). La nivelul regiunii variabile aminoacizii sunt foarte diferiţi. Este regiunea care conferă specificitatea faţă de antigene. La nivelul regiunii constante aminoacizii sunt identici. Lanţurile L au o singură regiune constantă, iar lanţurile H au 3 regiuni constante. Există cinci clase de imunoglobuline: IgA (dimer), IgD, IgE, IgG (monomeri) şi IgM (pentamer).

Proprietăţile biologice ale imunogloblinelor. Moleculele de anticorpi prezintă două regiuni distincte din punct de vedere funcţional, Fab şi Fc, care au fost evidenţiate prin digestie cu enzime proteolitice. Prin urmare, în ansamblul efectorilor sistemului imunitar, moleculele de imunoglobulină îndeplinesc două categorii de funcţii:

A. Funcţii de specificitate: legarea de antigen este fundamental dependentă de regiunile variabile localizate în zona Fab a moleculei. Specificitatea imunoglobulinei faţă de un antigen este exprimată prin capacitatea de recunoaştere fină a epitopului complementar al antigenului şi de combinare cu acesta. Specificitatea moleculei de imunogobulină este conferită de situsul său de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi asigură o diversitate uriaşă a situsurilor de

combinare, de ordinul a 10^8 – 10^9 specificităţi de legare. Potrivirea spaţială dintre situsul de combinare al moleculei de anticorp şi epitopul specific, din punctul de vedere al configuraţiei spaţiale, este perfectă.

B. Funcţii biologice efectoare: regiunea Fc oferă moleculei de imunoglobulină capacitatea de fixare a complementului, de transfer placentar şi de legare la receptorii Fc. Legarea unui anticorp de un antigen nu are un efect biologic direct. Mai degrabă, efectele biologice importante sunt o consecință a unor funcții efectoare secundare ale anticorpilor:

B.1. *Fixarea complementului.* Sistemul complement constă dintr-un număr de proteine mici din sânge, în general sintetizate de către ficat, care în mod normal circulă sub forma unor precursori inactivi (pro-proteine). Când sunt stimulate de către anumiţi inductori, proteazele scindează aceste proteine precursor eliberând citokine și inițiază o cascadă de amplificări şi scindări ulterioare. Rezultatul final al acestei cascade de activare este amplificarea masivă a răspunsului și activarea complexului de atac al membranei, rezultând în uciderea celulelor. Peste 30 de proteine și fragmente proteice alcătuiesc sistemul complement, inclusiv proteine serice, proteine seroase şi receptorii membranei celulare. Acestea reprezintă aproximativ 5% din fracțiunea globulinică a serului sanguin și pot servi ca opsonine.

Sistemul complement poate fi activat prin una din cele trei căi (clasică, alternativă sau calea lectinei), două arii structurale diferite ale imunoglobulinelor fiind probabil responsabile de iniţierea cascadei complementului pe fiecare din aceste căi. Consecinţele activării complementului includ liza celulelor și eliberarea moleculelor biologic active. Mecanismul amplificator extrem de important asigură eliminarea agenţilor infecţioşi şi neutralizarea toxinelor microbiene, mediată de anticorpi. Sistemul complement este o parte a sistemului imunitar, care ajută sau completează capacitatea anticorpilor și a celulelor fagocitare de a inactiva agenţii patogeni. Face parte din sistemul imun înnăscut, care nu este adaptabil și nu se schimbă pe parcursul duratei de viață a unui individ, însă poate fi stimulat de către sistemul imunitar adaptativ.

B.2. *Transferul placentar*. La om, singura imunoglobulină majoră transferată de la mamă la făt este IgG. Transferul placentar al IgG este un proces activ, concentraţia IgG în circulaţia fetală fiind adesea mai înaltă decât în sângele matern. Fătul sintetizează numai cantităţi reduse de IgM, fiind dependent de IgG transferat transplacentar câteva luni după naştere.

B.3. *Legarea la receptorii Fc a diferitelor tipuri de celule*. Celulele fagocitare, limfocitele, trombocitele, mastocitele și bazofilele au receptori care se leagă de imunoglobuline, astfel activându-se celulele pentru a efectua o anumită funcție. De asemenea, unele imunoglobuline se leagă de receptorii de pe trofoblaste, ceea ce duce la transferul imunoglobulinei prin placentă. Ca urmare, anticorpii materni transferaţi astfel conferă imunitate la făt și nou-născut. S-a descoperit că, teoretic, toate tipurile celulare implicate în răspunsul imun leagă unul sau mai multe izotipuri imunoglobulinice prin receptori Fc de suprafaţă.

8.1.3. Antigenitatea şi imunogenitatea

Cele două proprietăţi de bază ale antigenelor sunt imunogenitatea şi antigenitatea. Imunogenitatea reprezintă capacitatea unui antigen sau epitop de a induce un răspuns imun. Antigenitatea sau reactivitatea antigenică se referă la capacitatea antigenelor de a interacţiona

specific cu anticorpii sau cu receptorul pentru antigenul complementar al limfocitelor sensibilizate. Toate moleculele imunogene au capacitate antigenică dar nu şi invers. Antigenele capabile de antigenitate şi imunogenitate sunt antigene complete. Acestea sunt molecule *non-self* formate din gruparea purtător (Fc) şi epitop, cu o greutate moleculară de peste 10 kDa, structură chimică complexă (proteine, polizaharide, lipopolizaharide etc) şi o conformaţie spaţială stabilă. Antigenele incomplete (haptenele) posedă antigenitate dar sunt lipsite de imunogenitate (săruri ale metalelor grele, polen, medicamente, coloranţi, oligonucleotide etc). Pot deveni imunogene combinându-se cu macromolecule purtătoare (proteine sau polizaharide). Super-antigenele sunt molecule proteice particulare (enterotoxinele stafilococice, toxina şocului toxic stafilococic, toxina exfoliativă a stafilococilor, nucleocapsida virusului rabic), capabile să stimuleze un număr mare de limfocite T şi să provoace reacţii imunopatologice.

Antigenele virale sunt proteine sau glicoproteine de înveliş (peplos), nucleoproteine ori enzime. Imunomodulatorii bacterieni sunt în cea mai mare parte constituenţi de origine parietală sau ribosomală. În structura antigenică a celulei bacteriene se disting mai multe tipuri de antigene:

- antigene O somatice, lipopolizaharidice;
- antigene H flagelare, proteice;
- antigene K capsulare;
- antigene F fimbriale.

Imunogenitatea este o caracteristică a întregii macromolecule antigenice, în timp ce antigenitatea este specific determinată de anumite secvenţe ale antigenului. Suprafeţe limitate din macromolecula antigenică, apte să se combine cu anticorpi specifici sau cu receptorii de pe limfocitele sensibilizate se numesc **determinante antigenice sau epitopi**. În cazul glucidelor, epitopul este format din 4-6 monozaharide. Polizaharidele sunt formate dintr-un epitop repetat sau dintr-un număr redus de epitopi diferiţi. Polizaharidele sunt antigen T-independente, pot induce sinteza de anticorpi fără intervenţia limfocitelor T. Constituiţi din câţiva aminoacizi, epitopii proteici sunt clasificați ca fiind continui sau discontinui, în funcție de faptul dacă aminoacizii incluși în epitop sunt adiacenți în lanțul polipeptidic sau nu. Majoritatea epitopilor sunt discontinui și, din moment ce constau din reziduuri de suprafață reunite prin plierea lanțului peptidic, reactivitatea lor antigenică depinde de conformația nativă a proteinei. Epitopii liniari (secvenţiali) sunt determinaţi de structura primară a aminoacizilor (8-30 aminoacizi). Epitopii conformaţionali sunt determinaţi de structura secundară sau terţiară a moleculei proteice (juxtapoziţia în spaţiu a aminoacizilor situaţi la distanţă) şi se modifică la denaturarea proteinei. Fiecare moleculă proteică reprezintă un mozaic de epitopi, fie diferiţi, fie identici. Proteinele sunt antigen T-dependente, deoarece ele induc sinteza anticorpilor doar prin cooperarea dintre limfocitele T şi B. Numărul de epitopi de pe o moleculă imunogenă reprezintă valenţa antigenică. Structura cuaternară a capsidelor virale dă naștere epitopilor cunoscuți sub numele de neotopi. Neotopii apar fie prin modificări conformaționale ale proteinelor capsidei induse de interacțiunile intersubunitare, fie prin juxtapunerea reziduurilor din subunitățile învecinate formând un epitop nou.

Antigenul leucocitar uman (HLA) este denumirea pentru antigenele care sunt produsele unui complex de gene situate pe mai mulți loci strâns înlănțuiți, localizat pe cromosomul 6. Acest grup de gene numit complexul major de histocompatibilitate (MHC) este legat de funcția sistemului imunitar la om și codifică proteinele aflate pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen.

Antigenele leucocitare umane sunt esențiale pentru funcția imunitară, fiind împărțite pe mai multe clase MHC:

1. MHC clasa I prezintă peptide din interiorul celulei (inclusiv peptide virale, dacă acestea sunt prezente), de mici dimensiuni, cu o lungime de 8-10 aminoacizi. Antigenele străine prezentate de MHC clasa I atrag celulele NK (CD8+), care distrug celulele;

2. MHC clasa II prezintă antigene din exteriorul celulei limfocitelor T. Aceste antigene stimulează multiplicarea celulelor T-helper, care, la rândul lor, stimulează celulele B să producă anticorpi specifici. Antigenele proprii organismului sunt inhibate de celulele T supresoare;

3. MHC clasa III codifică componentele sistemului complement.

Epitopii MHC clasa I şi II pot fi determinaţi *in silico*. Epitopii limfocitelor B pot fi exploraţi structural (cristalografie cu raze X, rezonanţă magnetică nucleară, microscopie electronică de baleaj) sau funcţional (Western Blot, Elisa).

Imunogenitatea este capacitatea unei proteine de a da naștere unui răspuns imun la o gazdă competentă și poate fi definită numai în contextul biologic al gazdei. Cunoașterea situsurilor antigenice recunoscute de anticorpi nu indică neapărat ce structură imunogenă a inițiat producerea de anticorpi în gazda imunizată. Eșecul de a face diferența între antigenitate și imunogenitate este responsabil pentru lipsa de succes în dezvoltarea vaccinurilor sintetice peptidice (Van Regenmortel 2008).

Screeningul *in silico* al imunogenităţii

Peptidele sunt polimeri compuși din până la 40 de aminoacizi, ce pot să apară în mod natural în organism sau pot fi produse în laborator prin sinteză chimică (produse peptidice sintetice) sau prin tehnologia ADN recombinat. În unele circumstanțe, impuritățile legate de peptide pot crea un potențial pentru diferențe în capacitatea de a genera imunogenitate sau pot afecta în alt mod siguranța sau eficacitatea unui produs medicamentos peptidic. Prin urmare, este recomandată evaluarea imunogenităţii non-clinice, care compară o peptidă generică sintetică cu produsul peptidic de referință. Tehnica implică următoarele etape:

1. Se identifică secvența proteinelor în anticorpul de interes;
2. Se obține o structură 3D experimentală a unui alotip al HLA selectat din baze de date sau modelat prin omologie cu cea mai similară structură;
3. Se taie secvența de proteine în peptide scurte care se suprapun, constând de obicei din 8 până la 20 de aminoacizi (cadre);
4. Conformații multiple ale peptidei testate sunt preluate din baze de date sau prin algoritme de modelare computerizată;
5. Se modelează computerizat o posibilă structură a complexului HLA / peptidă;
6. Interacțiunea moleculară dintre peptidele scurte și moleculele HLA este evaluată prin calcularea energiei potențiale și a entropiei conformaționale a structurii complexe;
7. Fiecare peptidă este clasificată după scorul calculat;
8. Pe baza acestor date se construiește un profil statistic.

Conținutul în epitopi ce activează celulele T, unul dintre factorii ce contribuie la riscul imunogenității, poate fi măsurat relativ precis utilizând instrumente *in silico*. Algoritmii

imunoinformatici pentru identificarea epitopilor celulelor T sunt aplicați pentru a diminua riscul asociat proteinelor terapeutice, în urma evaluării riscului de generare a imunogenității nedorite. Prin calcularea densității cadrelor cu scor mare într-o proteină este posibilă estimarea scorului de imunogenitate al acesteia. În plus, pot fi identificate subregiuni de cadre cu punctaje mari sau clustere cu imunogenitate potențială. Utilizând această abordare, se poate calcula imunogenitatea clinică a unei noi proteine terapeutice.

8.2. Tipuri de vaccinuri

După modul de obţinere, se disting următoarele tipuri de vaccinuri:

- vaccinuri vii cu microorganisme sau virusuri cu virulenţa atenuată
- vaccinuri cu microorganisme inactivate
- vaccinuri cu anatoxine
- vaccinuri vii cu organisme modificate genetic
- vaccinuri conjugate prin ataşarea covalentă a unor anatoxine
- vaccinuri recombinate subunitare conţinând proteine purificate
- vaccinuri cu vectori virali
- vaccinuri bazate pe peptide sintetice
- vaccinuri cu acizi nucleici

După numărul de componente antigenice conţinute:

- vaccinuri monovalente: conţin o singură specie de microorganisme sau o anatoxină
- vaccinuri polivalente: conţin mai multe microorganisme, virusuri sau anatoxine

După categoria agenţilor patogeni:

- vaccinuri împotriva îmbolnăvirilor cauzate de virusuri (gripă, variolă, rabie, febră galbenă, poliomielită, rujeolă, rubeolă, hepatită A şi B, herpes, enteroviroze, febră Dengeue, febră de Colorado, mononucleoză infecţioasă, papilomatoză, rotaviroze, HIV etc)
- vaccinuri împotriva îmbolnăvirilor cauzate de bacterii (tuberculoză, antrax, tetanos, difterie, tuse convulsivă, leptospiroză, bruceloză, tularemie, lepră, pestă, sifilis, pneumonii pneumococice, infecţii streptococice, stafilococice, gonococice, cu *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Haemophyllus influenzae* tip b, *Pseudomonas aeruginosa* etc)
- vaccinuri împotriva îmbolnăvirilor cauzate de paraziţi (malarie, schistosomiază, leichmanioză etc)
- vaccinuri împotriva îmbolnăvirilor cauzate de micromicete (candidoză etc)

Autovaccinul este preparat dintr-o tulpină bacteriană izolată de la un bolnav şi este destinat aceluiaşi bolnav.

Metoda convenţională de obţinere a antigenelor imunogene prin cultivarea agentului infecţios trebuie să asigure câteva precondiţii:

- Posibilitatea de producere în bioreactor a agentului infecţios şi selectarea tulpinii;
- Identificarea celulei gazdă potrivite, dacă este un virus;
- Proiectarea unui proces tehnologic adaptat bolii căreia i se adresează vaccinul;

• Respectarea cerințelor de producție la un nivel ridicat de biosecuritate pentru protejarea operatorilor și a mediului înconjurător.

Succesiunea etapelor tehnologice şi echipamentele necesare producţiei de vaccinuri sunt disponibile pe site-ul firmei Sartorius în secţiunea *Vaccine Development Platforms*: (https://www.sartorius.com/en/applications/biopharmaceutical-manufacturing/vaccines).

8.2.1. Vaccinuri vii atenuate

Sunt tulpini microbiene a căror virulenţă a fost atenuată, se pot multiplica fără a produce boala, dar induc sinteza anticorpilor specifici. Astfel sunt antivariolic, vaccinul antituberculos (BCG), antirabic, antipoliomielitic oral (OPV, Sabin), antivaricelic, antirujeolic-antiurlian-antirubeolic (ROR), antirotavirus şi împotriva febrei galbene. Avantajul acestor vaccinuri îl constituie eficienţa ridicată datorită imunităţii umorale şi celulare de lungă durată pe care o furnizează. Dezavantajele sunt date de stabilitate şi siguranţă. Riscul major îl constituie instabilitatea tulpinilor, care pot reveni teoretic la formele virulente. În cazul OPV, riscul de poliomielită asociată vaccinării având o frecvenţă cuprinsă între 0,0002 şi 0,0004%. Se estimează că acest vaccin este responsabil de apariţia a 12 cazuri de poliomielită pe an, la nivel global (https://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tech_support/Part-2.pdf).

Atenuarea acţiunii virusurilor se obţine pe mai multe căi:

• Cultivarea agentului infecţios în condiţii suboptime;

• Inocularea virusului patogen sau parţial atenuat, pe o cale nenaturală, adică alta decât cea prin care virusul pătrunde în mod obişnuit în organism. Metoda este folosită pentru vaccinarea animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei păsărilor, se administrează prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseşte, deoarece riscul infecţiei este mare;

• Pasajul virusului de origine umană într-un substrat nenatural *in vivo* sau *in vitro*. Cele mai importante vaccinuri pentru om şi animale s-au obţinut pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat, prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule. Exemple:

- virusul febrei galbene inoculat la şoarece şi apoi în embrioni de găină;
- poliovirusul inoculat în celulele de rinichi de maimuţă;
- virusul rujeolei inoculat în fibroblaste de embrion de găină.

Obţinerea vaccinurilor atenuate. Convenţional, antigenul este crescut în cultură, purificat şi apoi atenuat fără pierderea capacităţii de a induce un răspuns imun împotriva formei virulente a patogenului respectiv. Vaccinurile vii cu microorganisme atenuate genetic sunt obţinute cu ajutorul unor tulpini recombinate, în genomul cărora s-au efectuat diferite deleţii pentru eliminarea factorilor de patogenitate ori a căilor de revenire la forma virulentă, cu condiţia de a nu reduce proprietăţile imunogene. Spre exemplu, vaccinul antiholeric viu cu tulpina CVD103 induce răspuns umoral prevenind colonizarea intestinală cu *Vibrio cholerae*, însă genele responsabile de toxinele accesorii ce induc efecte secundare (diaree) au fost eliminate.

Limitări ale modului de producere a vaccinurilor atenuate:

- Nu toţi agenţii infecţioşi pot fi crescuţi în cultură;
- Producerea virusurilor umane sau animale necesită culturi celulare, ceea ce este scump;
- Rata producerii virusurilor umane este redusă, iar producerea vaccinurilor costisitoare;

- Necesitatea unor măsuri de protecţie foarte stricte pentru protecţia personalului din laboratoare;
- Seriile de vaccinuri pot să nu fie omorâte sau suficient atenuate, introducându-se organisme virulente în vaccin şi astfel risc de răspândire a bolii;
- Tulpinile atenuate pot reveni la forma virulentă, de aceea sunt necesare teste continue care să asigure că reinstalarea virulenţei nu avut loc;
- Nu toate bolile pot fi prevenite prin utilizarea vaccinurilor tradiţionale;
- Cele mai multe vaccinuri curente au o durată de viaţă limitată şi adesea necesită refrigerare pentru a le menţine potenţa. Aceasta este o problemă în ţările cu mari zone rurale neelectrificate.

8.2.2. Vaccinuri inactivate

Inactivarea agentului patogen se obţine prin tratare cu agenţi fizici şi chimici (prin căldură la 50-60°C, fierbere sau autoclavare, prin iradiere şi mai ales folosind antiseptice de tip formol sau fenol). Astfel de exemple sunt vaccinul antitifo-paratific (TAB), primul vaccin antipoliomielitic, injectabil (IPV, Salk), vaccinul împotriva hepatitei A, vaccinul celular împotriva tusei convulsive. Nu prezintă pericolul revenirii la formele virulente, însă au inconvenientul că sunt mai scumpe şi nu sunt la fel de imunogene ca şi cele vii, atenuate. Pentru o eficienţă îmbunătăţită sunt necesare suplimentar doze de rapel. De asemenea, induc frecvent efecte secundare de tipul reacţiilor obişnuite.

8.2.3. Vaccinuri subunitare

S-a constatat că în cazul unor germeni nu este necesară prezenţa întregului agent patogen pentru a induce răspunsul imun. La bacterii, anumite componente celulare, iar la virusuri capsida sau proteinele învelişului pot realiza acest lucru. Vaccinurile care utilizează componente ale organismului patogen se numesc vaccinuri subunitare. Tehnologia ADN recombinat şi a proteinelor recombinate realizează noi vaccinuri subunitare. Avantajele majore ale vaccinurilor subunitare sunt legate de stabilitate şi siguranţă. Dezavantajele vaccinurilor subunitare sunt generate de dificultăţile şi costurile de producţie. Tipuri de vaccinuri subunitare sunt cele care utilizează fragmente proteice sau mai nou particule asemănătoare virusului (*virus-like particles*, VLP), polizaharide conjugate sau anatoxine.

Vaccinuri pe bază de proteine imunogene

Spre exemplu, vaccinul acelular împotriva tusei convulsive conţine componente individuale purificate ale bacteriei *Bordetella pertussis*. Vaccinul împotriva hepatitei B conţine antigenul de suprafaţă al virusului. Iniţial era produs prin purificarea din plasma recoltată de la bolnavi, iar în prezent este disponibil vaccinul recombinat. Utilizându-se proteine imunogene purificate se asigură un preparat stabil şi sigur care este definit precis din punct de vedere chimic şi nu conţine alte proteine sau acizi nucleici care pot iniţia efecte nedorite în organismul gazdă. Purificarea unei proteine specifice este însă costisitoare, iar în anumite situaţii, o proteină izolată poate să nu aibă

aceeaşi conformaţie ca şi *in situ* (ex. ca în capsida virală sau în înveliş) iar ca rezultat, antigenitatea este alterată.

Vaccinurile recombinate

Tehnologia ADN recombinat oferă posibilitatea realizării unei noi generaţii de vaccinuri, care previn limitele celor tradiţionale. Manipularea prin deleţia unor factori de patogenitate permite atenuarea genetică a virulenţei, cum este cazul vaccinului antiholeric viu cu tulpină recombinată. Disponibilitatea genelor clonate a permis cercetătorilor să realizeze strategii noi pentru producerea vaccinurilor. Celule bacteriene sau de drojdii reprogramate genetic, care pot produce cantităţi mari de proteine imunogene, au devenit elementele de bază pentru prepararea unor vaccinuri eficiente. Este cazul vaccinului împotriva hepatitei B, pentru care gena uneia dintre proteinele învelişului viral a fost inserată în celule de drojdie. Acestea produc antigenul de suprafață al hepatitei B (HBsAg) care este ulterior purificat.

Avantajele vaccinurilor obţinute prin tehnologia ADN recombinat:

- Antigenul necesar inducerii imunităţii este izolat de restul componentelor microbiene (factorilor de virulenţă), fiind sintetizat de un microorganism sau celulă eucariotă, modificate prin inginerie genetică;
- Vaccinurile produse prin inginerie genetică nu implică aplicarea unor procedee de inactivare (inactivarea reduce semnificativ şi capacitatea imunogenă protectoare);
- Sunt reduse mult costurile de producţie;
- Nu sunt necesare instalaţii care asigură măsuri severe de securitate;
- Aceste vaccinuri nu conţin germeni care produc îmbolnăviri;
- Costurile de transport şi depozitare pot fi mai mici datorită reducerii aparaturii de refrigerare şi liofilizare.

Vaccinuri conjugate

Unele vaccinuri pentru prevenirea infecțiilor bacteriene se bazează pe polizaharide ale învelişului, însă utilitatea acestora a fost limitată, deoarece nu dau răspunsuri imune puternice. Vaccinurile conjugate se obţin prin atașarea covalentă a unor anatoxine proteice la antigene polizaharidice, inducându-se astfel un răspuns imun amplificat şi durabil. Exemple: vaccinul împotriva pneumococilor, meningococilor şi *Haemophilus influenzae* tip b (Hib).

Vaccinuri cu anatoxine

Anatoxinele sunt toxine modificate care şi-au pierdut toxicitatea, dar induc sinteza anticorpilor specifici. Astfel de vaccinuri sunt utilizate atunci când o toxină bacteriană, de regulă o exotoxină este cauza principală a bolii. Toxinele bacteriene purificate sunt inactivate prin tratare termică sau chimică, cu formalin. În contact cu anatoxina inofensivă, sistemul imunitar învață cum să lupte împotriva toxinei naturale, producând anticorpi. Vaccinurile împotriva difteriei și tetanosului (DT), precum şi cel antibotulinic au înlocuit utilizarea seruruilor în ţările dezvoltate.

Noi abordări ale vaccinurilor subunitare – particule asemănătoare virusului

Proteinele recombinate reprezintă o parte semnificativă a compuşilor candidaţi pentru dezvoltarea de nanovaccinuri, fiind promițătoare pentru o serie de boli virale, precum infecţia cu virusul sincițial respirator (RSV), HIV și virus gripal. Spre exemplu, mai multe molecule candidat pentru vaccinul antigripal subunitar se bazează pe componente proteice precum nucleoproteine (NP), domeniul extracelular al proteinei transmembranare M2 (M2e) şi hemaglutinine (HA). Peste 30% dintre candidații la vaccinul împotriva COVID-19 propun vaccinarea cu proteine recombinate, majoritatea concentrându-se pe spiculele (glicoproteina *spike*) virusului. Avantajul utilizării acestei strategii dovedite într-o situație pandemică este capacitatea de a produce un vaccin sigur printr-un proces extrem de productiv, care poate fi fabricat în instalațiile existente.

Particulele asemănătoare virusului sunt structuri multiproteice care imită organizarea și conformaţia virusurilor native autentice în lipsa genomului viral, producând teoretic un răspuns imun mai bun la o doză mai mică. VLP sunt produse prin exprimarea individuală a proteinelor structurale virale, care se pot autoasambla în structura asemănătoare virusului. Pot fi utilizate mai multe sisteme de exprimare: bacterii, drojdii, celule de insecte, plante sau linii celulare de mamifere, în funcție de complexitatea VLP. Un exemplu de succes îl constituie vaccinul cu VLP conţinând antigenele papilomavirusului uman (HPV) produse în celule de drojdie. Marea variabilitate a vaccinurilor cu proteine recombinate elimină posibilitatea unei platforme gata de utilizare care să susțină toate etapele de dezvoltare, astfel încât sunt necesari parteneri strategici şi soluții inovatoare pentru a permite dezvoltarea unor vaccinuri extrem de productive și sigure. Un vaccin antigripal experimental care conține feritină, şi care se poate autoasambla în nanoparticule care prezintă un antigen proteic se află într-un studiu de stadiu incipient (Darricarrere şi colab. 2018). Tehnologia bazată pe nanoparticule este evaluată ca o platformă pentru dezvoltarea vaccinurilor împotriva rotavirusurilor, coronavirusului MERS, RSV și virusului Epstein Barr (Laimbacher şi colab. 2012; Hashemzadeh şi colab. 2020; Quan şi colab. 2020; van Zyl şi colab. 2019). Un vaccin candidat multivalent ţinteşte imunizarea împotriva a patru virusuri transmise de ţânţari: Zika, Chikungunya, febrei galbene şi encefalitei japoneze (Garg şi colab. 2020).

În prezent, tehnica VLP a fost implementată şi pentru dezvoltarea unor vaccinuri inovatoare bazate pe proteine antigenice şi terapeutice produse în plante. Secvenţe cunoscute de ADN sunt inserate cu ajutorul vectorilor virali precum *Agrobacterium tumefaciens* în specia *Nicotiana benthamiana*, ce produce la nivel foliar produsul recombinat. Producerea unui vaccin antigripal tetravalent (QIV, Medicago) a condus la rezultate promiţătoare în studii clinice pe subiecţi umani (Ward şi colab. 2020).

8.2.4. Vaccinuri cu vectori virali recombinaţi

Vaccinurile pe bază de vectori virali constituie o componentă promițătoare a producţiei biofarmaceutice. Peste 40 de vectori virali sunt utilizați în prezent pentru terapia genică și dezvoltarea de vaccinuri. Cel mai frecvent sunt utilizate adenovirusurile și poxvirusurile (virusul vaccinia modificat) pentru vaccinuri, parvovirusurile (virusuri adeno-asociate) şi herpesvirusurile (virusul *Herpes simplex*) pentru terapia genică, iar retrovirusurile (mai ales lentivirusuri) pentru

terapia celulară (vezi capitolul Terapii genetice şi celulare). Tehnologiile inovatoare asigură procese mai productive, intensificate și flexibile.

Utilizarea adenovirusurilor recombinate ca vectori. Adenoviridele cuprind virusuri nude, fiind recunoscute 57 de tipuri de adenovirusuri umane, unele asociate cu diverse afecţiuni: boli respiratorii, conjuctivită, gastroenterită, obezitate etc. Au o moleculă liniară de ADN dublucatenar de 26-35 kb a cărei replicare are loc în nucleul celulei vertebratelor, utilizând resursele acesteia. Vectorii adenovirali recombinați, inclusiv tipurile nereplicative, pot furniza gene codificatoare pentru antigene specifice. Utilizate în mod obișnuit ca vectori virali, adenovirusurile oferă o gamă largă de avantaje: pot fi uşor manipulate genetic, sunt nereplicative, acceptă inserturi mari de ADN transgenic şi generează un răspuns celular şi umoral specific transgenei. Sunt evaluate şi ca vectori pentru terapia genică, dar sunt utilizate în cea mai mare parte pentru dezvoltarea vaccinurilor. Posibilele probleme legate de utilizarea adenovirusurilor ca vectori ai vaccinurilor includ: corpul uman dezvoltă imunitate la vectorul în sine, ceea ce face ca dozele de rapel să fie dificile sau imposibile. În unele cazuri, oamenii au imunitate preexistentă la adenovirusuri, ceea ce face ca cedarea vectorilor să fie ineficientă.

Peste 50% din vaccinurile candidat pe bază de vectori virali utilizează în prezent adenovirusuri. Vectorii adenovirali de generația a treia sunt folosiți pentru prevenirea sau tratarea bolilor infecțioase precum Ebola, Zika, malaria, hepatita C, HIV-SIDA și COVID-19. De asemenea, sunt testaţi în studii clinice pentru imunoterapia anticancerigenă. Adenovirusul recombinat de tip 5 (Ad5) și adenovirusul Ad26 sunt folosite ca vectori în vaccinuri candidat împotriva COVID-19, cu scopul este de a exprima glicoproteina *spike* a SARS-CoV-2. Alte stategii implică adenovirusuri de cimpanzeu modificate pentru a bloca receptorii umani ACE2 etc.

Primul vaccin împotriva virusului Ebola, aprobat în anul 2019 este un vaccin recombinat cu vector viral reprezentat de virusul stomatiei veziculare (VSV), modificat genetic pentru a exprima glicoproteina de suprafaţă a virusului Ebola Zaire (Public Health Agency of Canada, NewLink Genetics şi Merck). Un al doilea vaccin a fost aprobat în anul 2020, acesta fiind primul vaccin cu vector adenoviral lansat pe piață (Johnson & Johnson şi Janssen Pharmaceutical). Este un vaccin cu două componente diferite pentru prima inoculare şi respectiv pentru doza de rapel. Prima componentă este derivată din adenovirusul uman Ad26 şi exprimă o glicoproteină a virusului Ebola Mayinga. A doua componentă constă într-un virus vaccinia tulpina Ankara ce codifică glicoproteine ale virusurilor Ebola Sudan, Marburg şi Tai Forest.

Utilizarea virusurilor vaccinale recombinate ca vectori. Virusul vaccinei face parte din familia poxvirusurilor cu genomul constituit dintr-o moleculă de ADN dublucatenar care conţine aproximativ 187 kb şi codifică aproximativ 200 de proteine diferite. Acest virus a fost bine caracterizat la nivel molecular şi este considerat de obicei un virus benign, de aceea este un posibil vector. O importantă trăsătură a unui vector este exprimarea genelor clonate ce codifcă antigene care, la rândul lor determină formarea anticorpi neutralizanţi împotriva agentului patogen. Genomul virusului vaccinei este mare şi permite inserarea ADN adiţional direct în genomul viral, prin recombinare homoloagă *in vivo*. Un număr mare de gene pentru diferite antigene au fost inserate în virusul vaccinei şi exprimate în celule animale, de exemplu: proteina G a virusului rabiei, antigenul de suprafaţă al virusului hepatitei B, proteinele NP şi HA de la virusul gripal, glicoproteine de la virusul *Herpes simplex*.

Avantajele utilizării unui vaccin viral recombinat faţă de vaccinurile cu virusuri inactivate sau vaccinurile subunitare:

- Virusul poate exprima antigene autentice într-o manieră asemănătoare infecţiei naturale;
- Virusul se poate replica în organismul gazdă, astfel amplifică nivelul antigenului, activează eliberarea anticorpilor din celulele B (răspuns umoral) şi stimulează producerea celulelor T (răspuns imun mediat celular);
- Inserţia genelor pentru antigen la un situs sau mai multe în genomul vectorului determină reducerea virulenţei acestuia.

Dezavantajele vaccinuilor cu vectori virali recombinaţi:

- Vaccinarea unei gazde imunosupresate poate determina serioase infecţii. Un mod de a evita acest lucru este prin inserţia genelor pentru IL-2 umană în vectorul viral. Aceste gene vor permite gazdei să limiteze proliferarea vectorului viral prin creşterea răspunsului celulelor T a sistemului imun, reducâd posibilitatea infecţiilor cu patogeni oportunişti;
- Majoritatea vaccinurilor ADN au fost administrate prin injecţii intramusculare sau intradermale. Cu toate că ele pot produce un răspuns imun, nu pot induce şi o imunitate a mucoaselor (respiratorie, intestinală sau a căilor urogenitale), acestea fiind cele care împiedică patogenii să intre în corp. Chiar dacă vaccinul ar fi administrat la nivelul mucoaselor, suprafaţele lor reprezintă bariere protective iar pentru eficienţă vaccinul ar trebui eventual tratat cu agenţi specifici care să penetreze sau să creeze legături cu mucoasa (ex. adjuvanţi mucozali).

Noi abordări ale vaccinurilor cu vectori recombinaţi – vezicule asemănătoare virusului

În ciuda succesului înregistrat de vaccinurile recombinate în ceea ce priveşte rezultatele imunogenităţii în modele experimentale animale, utilizarea translațională a vectorilor virali la om este adesea împiedicată de preocupările de siguranță. Astfel, a apărut ideea unui nou tip de vector de vaccin fără patogenitate detectabilă, sub forma veziculelor asemănătoare virusului (*virus-like vesicles*, VLV). VLV sunt vezicule membranare care seamănă cu virusurile învelite, dar cărora le lipsesc capsida și genomul viral. Tehnica este utilizată pentru dezvoltarea vaccinurilor terapeutice, atât antiinfecţioase cât şi oncologice.

Spre exemplu, un vaccin VLV împotriva infecţiei cu virusul hepatitei B (HBV) propune un vector hibrid compus din repliconul virusului Semliki Forest (SFV), ce exprimă proteine nestructurale, şi glicoproteina G a virusului stomatitei veziculare (VSV) în locul proteinelor structurale ale SFV. Aceste vezicule pot fi modificate pentru exprimarea unor gene diverse, fără limite în ceea ce priveşte dimensiunea insertului. Astfel de VLV au fost utilizate pentru exprimarea proteinelor mijlocii din învelişul virusului hepatitei B (MHBs) şi a antigenului nucleocapsidei (HBcAg). Cadrele de citire deschise (ORF) ale genelor pentru MHBs şi HBcAg au fost amplificate, genele au fost clonate în plasmide pCMV-SFV, iar trei tipuri de vezicule (VLV-MHB, VLV-HBcAg şi VLV-glicoproteina VSV) au fost utilizate pentru transfecţia celulelor renale de hamster BHK-21 (Reynolds şi colab. 2015). Totuşi, pentru un răspuns imun amplificat al limfocitelor T, necesar obţinerii de rezultate în terapie, s-a observat că vectorii policistronici sunt mai eficienţi. Secvenţe modificate a trei tipuri de antigene HBV (MHBs, HbcAg şi Pol) au fost co-exprimate într-un singur ORF. În studii pe model murin, această abordare a VLV multiantigen a dovedit eficienţă atât în ceea ce priveşte protecţia la infecţie cât şi în răspunsul terapeutic (Yarovinski şi colab. 2019).

8.2.5. Vaccinuri cu acizi nucleici

Denumite şi vaccinuri genetice, sunt obţinute prin tehnici de manipulare genetică şi presupun administrarea directă a ADN sau ARNm ce codifică antigenul. **Vaccinurile ADN** oferă cel mai bun răspuns imun atunci când se utilizează vectori de exprimare foarte activi, precum plasmidele modificate. Acestea deţin un puternic promotor viral ce conduce la transcrierea și traducerea *in vivo* a genei sau ADN-ului complementar de interes. Promotorii utilizaţi sunt cei de la virusul simian vacuolant 40 (SV40), virusului sarcomului Rous, citomegalovirusului (CMV), ubiquitinei C umane, fosfoglicerat-kinazei, beta-globinei etc. Un exemplu de vector plasmidial este pVAC, un construct care folosește promotorul SV40. Modificări suplimentare pentru îmbunătățirea stabilităţii ARNm şi a ratelor de exprimare includ optimizarea codonilor genei exprimate, inserarea de secvenţe de amplificare, introni sintetici, secvențe lider tripartit adenovirale și modificări ale secvențelor de poliadenilare și terminare transcripțională. Un semnal puternic de poliadenilare se obţine prin inserarea unor secvenţe ale hormonului de creștere bovin sau ale beta-globinei de iepure. Vectorii policistronici sunt construiți pentru a exprima mai multe molecule imunogene sau o moleculă imunogenă și o proteină imunostimulatoare. Administrarea directă a constructului prin vaccinul genetic elimină etapa de cultivare în celule procariote. Astfel, vectorii plasmidiali nu necesită situsuri adiţionale precum cel de origine a replicării sau markeri de selecţie.

O altă abordare eficientă pentru creșterea imunogenității vaccinului ADN este utilizarea „cocktailurilor de vaccin” care conțin vaccinul ADN, precum și plasmide care codifică proteinele imunomodulatoare cu rol adjuvant. ADN-ul plasmidial conține motive deoxicitidilat-fosfat-deoxiguanilat (CpG) care funcționează ca un adjuvant încorporat. Citokine, chemokine şi alte molecule pt fi coadministrate. Spre exemplu:

- IL-12, prima citokină testată ca adjuvant este produsă de celulele dendritice şi de monocite. Susţine răspunsul imunitar al celulelor T CD8+ antigen-specifice. Evaluarea unor plasmide bicistronice exprimând IL-12 şi antigene de la *Yersinia pestis* indică un bun răspuns imunologic;
- IL-2 joacă un rol esențial în răspunsul imun prin promovarea diferențierii celulelor T naive în celule T efectoare, prin generarea de rezerve de celule T cu memorie şi este necesară pentru proliferarea celulelor NK. Includerea genelor pentru IL-2 a dus la îmbunătățirea imunogenității vaccinurilor antivirale împotriva HIV, gripei şi SARS-CoV;
- IL-15 induce proliferarea limfocitelor T-NK, este necesară pentru generarea celulelor T CD4+ şi CD8+ şi importantă pentru generarea memoriei celulelor T CD8+. Efectele ei sunt potenţate dacă este livrată în tandem cu IL-21 sau cu alte interleukine. Este testată în vaccinuri anti-*Toxoplasma gonidii* şi anti-HIV (Suschak şi colab. 2017).

Avantajele vaccinurilor ADN:

- Nu prezintă risc de infecție;
- Sunt capabile să imunizeze împotriva mai multor agenţi patogeni cu diversitate antigenică;
- Produc antigenul *in vivo,* într-o formă naturală;
- Sunt capabile să stimuleze imunitatea umorală, celulară și mucozală;
- Oferă o imunitate durabilă;
- Nu generează răspuns imun la vectorul injectat sau antigene împotriva celulelor transfectate;
- Pot fi produse cu tehnologia existentă, la costuri rezonabile;
- Controlul calității se realizează simplu;

- Sunt stabile la diferite temperaturi și lanțul de refrigerare nu este necesar pentru stocare.

Limitările vaccinurilor ADN:

- Pot fi utilizate numai pentru antigenele proteice, nu şi pentru cele polizaharidice;
- Risc de dezvoltare a toleranţei faţă de antigen;
- Risc de afectare a genelor responsabile de factorii de creștere celulară şi risc tumoral;
- Risc de transfecţie a celulelor neţintă (a neuronilor);
- Risc de a provoca boli autoimune.

Modalităţi de livrare la ţintă a vaccinurilor genetice

Principalul impediment pentru vaccinurile ADN îl reprezintă imunogenitatea scăzută, datorită dificultăților în administrarea plasmidelor. Constructul plasmidial trebuie să traverseze membrana celulară fosfolipidică prin endocitoză sau pinocitoză, să eludeze enzimele endozomilor, lizosomilor, nucleazele citosolice și să se transloce prin învelișul nuclear. Spre deosebire de sistemele de cedare fizică, în livrarea moleculelor biofarmaceutice e nevoie de noi abordări pentru a crește eficiența transfecției vaccinului ADN.

Utilizarea liposomilor ca molecule purtătoare a devenit o metodă populară de administrare a vaccinurilor ADN, deoarece liposomii nu numai că sporesc eficiența transfecției, dar au și un efect adjuvant. Liposomii sunt vezicule sferice compuse din fosfolipide și colesterol, ce pot fuziona cu membranele lipidice celulare, ceea ce facilitează livrarea plasmidei în celule. Foarte important, veziculele lipidice pot fi formulate ca unilamelare sau multilamelare. Veziculele multilamelare permit livrarea susținută a vaccinului pe o perioadă extinsă de timp. În timp ce utilizarea liposomilor pentru administrare intramusculară a generat probleme de reactogenitate, complexele ADN - liposom au demonstrat un beneficiu imunologic. Injecția intramusculară a unei formulări liposomi - nucleoproteine gripale a generat un titru de anticorpi de 20 de ori superior vaccinului care conţine doar ADN.

Administrarea vaccinului ADN poate fi realizată și prin utilizarea de micro- și nanoparticule polimerice biodegradabile, constând în molecule amfifile cu dimensiuni cuprinse între 0,5-10 µm. Similar cu încărcarea ADN plasmidial pe liposomi, plasmidele pot fi încapsulate ori adsorbite pe suprafața nanoparticulelor. Micro- și nanoparticulele protejează ADN plasmidial de acţiunea nucleazelor şi promovează eliberarea susţinută. Polimerii cationici cu greutate moleculară mare s-au dovedit semnificativ mai eficienți decât liposomii cationici. ADN plasmidial imobilizat în microsfere polimerice acoperite cu chitosan biodegradabil (20 - 500 µm) poate induce răspuns imun mucozal şi sistemic. Beneficiile formulării în microsfere au fost evidenţiate la vaccinuri împotriva hepatitei B, a tuberculozei şi la oncovaccinuri. Sistemele de livrare pe bază de microparticule sunt capabile de îmbunătățirea semnificativă a imunogenității vaccinului ADN și creșterea răspunsurilor imune celulare și umorale. Ele pot fi preparate cu o diversitate structurală semnificativă (dimensiune, încărcare de suprafață, conținut de lipide) şi oferă o flexibilitate considerabilă a formulării, ceea ce permite optimizarea vaccinului pe baza nevoilor specifice ale clinicianului (Suschak şi colab. 2017).

8.2.6. Vaccinuri cu ARNm

Reprezintă o perspectivă foarte promițătoare a industriei biofarmaceuticelor, întrucât sunt neinfecțioase, neintegrante, nu implică celule, au o potență ridicată, o capacitate de dezvoltare rapidă și un potențial de fabricare cu costuri reduse, ușor ajustabilă şi cu productivitate mare, dar şi o administrare sigură. Vaccinurile ARNm sunt o adevărată platformă: același proces poate fi utilizat pentru a produce vaccinuri ARNm împotriva unor indicații diferite. Profilul de siguranță, rapiditatea și flexibilitatea strategiei de dezvoltare sunt incontestabile, dar fiind o tehnologie nouă, platforma evoluează rapid, iar parametrii procesului se schimbă continuu. Progresele tehnologice au depășit în mare măsură problemele legate de instabilitatea ARNm și dificultatea de a-l livra în celule, iar unele vaccinuri ARNm au demonstrat rezultate încurajatoare.

Tipuri de vaccinuri cu ARNm:

A. Vaccinuri cu ARNm auto-amplificator. Se bazează pe genomul unui alfavirus. Genele codificatoare ale mecanismului de replicare sunt intacte, iar genele codificatoare ale unor proteine structurale sunt înlocuite cu gene pentru antigenul de interes. În dezvoltare se află vaccinuri împotriva infecţiei cu SARS-CoV-2, citomegalovirus, virusul hepatitei C, gripal, Ebola, Zika, dar şi *Toxoplasma gonidii* sau *Streptococcus* sp. (Bloom şi colab. 2021).

B. Vaccinuri cu ARNm nereplicativ. Pot fi realizate *ex vivo* prin transfecţia celulelor dendritice (electroporare). În dezvoltare se află candidaţi la vaccinuri terapeutice anti-HIV şi oncologice. Pot fi administrate direct *in vivo*. Exemplu: un vaccin experimental ARNm modificat, încapsulat, indică în testele pe animale o protecţie împotriva infecției cu virusul Zika după o singură doză (Richner şi colab. 2017).

Farmacologia vaccinurilor ARNm

ARNm constituie un intermediar între traducerea ADN-ului care codifică proteinele și producerea proteinelor de către ribosomi în citoplasmă. Două tipuri majore de ARN sunt studiate în prezent ca vaccinuri: ARNm care nu replică și ARN auto-amplificator derivat viral. Vaccinurile convenționale pe bază de ARNm codifică antigenul de interes și conțin regiuni netraduse 5 ′ - 3 ′ (UTR, *untranslated region*), în timp ce ARN auto-amplificator codifică nu numai antigenul, ci tot mecanismul de replicare virală care permite amplificarea intracelulară a ARN și exprimarea abundentă a proteinelor.

ARNm transcris *in vivo* este produs dintr-o matriţă de ADN liniar folosind ARN polimeraza de la bacteriofagii T7, T3 sau Sp6. Produsul rezultat trebuie să conţină în mod optim un ORF care codifică proteina de interes, UTR-uri flancante, un capac 5′ și o coadă poliadenilată (poli (A)). ARNm este astfel conceput pentru a fi asemănător cu moleculele de ARNm mature complet procesate, ce apar în mod natural în citoplasma celulelor eucariote (Jackson şi colab. 2020a).

Complexarea ARNm pentru livrarea *in vivo* previne degradarea rapidă de către ribonucleaze a ARN-ului neprotejat. S-au dezvoltat o mare varietate de reactivi de transfecție *in vitro* și *in vivo* care facilitează absorbția celulară a ARNm, protejându-l de degradare. Odată ce ARNm ajunge în citosol, mecanismul de traducere celulară produce proteine care suferă modificări post-translaționale, rezultând o proteină pliată corect, complet funcțională. Această caracteristică a farmacologiei ARNm este deosebit de avantajoasă pentru vaccinurile și terapiile de înlocuire a

proteinelor, care necesită livrarea proteinelor citosolice sau transmembranare în compartimentele celulare corecte pentru o prezentare sau funcționare adecvată. ARNm transcris *in vivo* este în cele din urmă degradat de procese fiziologice normale, reducându-se astfel riscul de toxicitate a metabolitului (Pardi şi colab. 2018).

Strategiile pentru optimizarea farmacologiei ARNm includ:

- Analogii sintetici ai capacului 5' și enzimele responsabile stabilizează ARNm și cresc traducerea proteinelor prin legarea la factorul de inițiere a traducerii eucariote 4E (EIF4E);
- Elementele de reglare din regiunea 5'-UTR și 3'-UTR stabilizează ARNm și cresc traducerea proteinelor;
- Coada poli (A) stabilizează ARNm și intensifică translația proteinelor;
- Nucleozidele modificate scad activarea imunitară înnăscută și cresc traducerea;
- Tehnici de separare și / sau purificare: tratamentul cu ribonucleaze III și purificarea rapidă prin cromatografie lichidă cu proteine (FPLC) scad activarea imună și măresc traducerea;
- Optimizarea secvenței și / sau codonilor mărește traducerea;
- Modularea celulelor țintă: co-livrarea factorilor de inițiere a traducerii și alte metode modifică traducerea și imunogenitatea (Pardi şi colab. 2018).

Mai multe metode sunt testate pentru administrarea vaccinurilor ARNm:

- injectarea intramusculară, intradermală sau intranodală a ARNm ca atare sau complexat cu molecule purtătoare (*carrier*);
- utilizarea unor adjuvanţi ca sisteme de livrare: protamine, particule nanolipidice, particule polizaharidice, polimeri cationici, nanoparticule conjugate cu PEG;
- injectarea celulelor dendritice transfectate *ex vivo*.

Vaccinurile ARNm pot servi industria farmaceutică în condiţii de pandemie, având potențialul de a revoluționa dezvoltarea vaccinurilor. În fața pandemiei globale COVID-19, presiunea a fost mai mare ca niciodată pentru lansarea rapidă a unui vaccin eficient și sigur. Vaccinurile ARNm au câștigat vizibilitate în timpul crizei, deoarece această strategie a reușit să aducă primul vaccin candidat în faza de testare clinică, cu o viteză fără precedent.

Două vaccinuri împotriva infecţiei COVID-19 au fost aprobate la sfârşitul anului 2020. Cel fabricat de Moderna (candidatul mRNA-1273) conţine ARNm codifică antigenul S-2P, ce constă în glicoproteina *spike* a SARS-CoV-2 cu o ancoră transmembranară și un situs de clivaj S1 – S2 intact. S-2P este stabilizat în conformația sa prin două substituții de prolină la pozițiile de aminoacizi 986 și 987, în partea superioară a helixului central în subunitatea S2. Capsula nanolipidică include patru lipide şi a fost formulată într-un raport fix ARNm și lipide. Vaccinul este furnizat sub formă de lichid steril pentru injecție la concentrație de 0,5 mg/ml, diluat în soluție salină (Jackson şi colab. 2020b).

Vaccinul produs de Pfizer şi BioNTech (candidatul BNT162) este o construcţie de vaccin ARNm modificat ce codifică domeniul de legare al receptorului trimerizat al glicoproteinei *spike* a SARS-CoV-2. Molecula este formulată în nanoparticule lipidice pentru o eliberare mai eficientă în celule după injecția intramusculară (Mulligan şi colab. 2020).

8.2.7. Vaccinologia inversă

O revoluție majoră în descoperirea vaccinurilor este legată de apariția tehnologiilor de secvențiere a genomului, care permite determinarea întregului repertoriu antigenic al organismului infecțios şi identificarea unor potenţiale ținte. Metoda vaccinologiei inverse oferă o schimbare în perspectiva proiectării vaccinului, iar ideea a luat naștere pentru a depăși problemele cu care se confruntă dezvoltarea unui vaccin eficient împotriva meningitei provocate de *Neisseria meningitidis* tip B (MenB). Secvențierea genomului tulpinii virulente MenB MC58 a permis selectarea unor potențiale ținte pentru vaccin. Principiul de la bază a pornit de la ideea că țintele de succes ale unui vaccin sunt proteine, fie expuse pe suprafața agentului patogen, fie secretate în mediul extracelular. Pornind de la 2.158 ORF, analiza bioinformatică a indicat faptul că peste 600 codifică proteine expuse la suprafață sau secretate. Dintre acestea, 350 de gene codificatoare au fost selectate pentru clonare în *Escherichia coli*, exprimate și utilizate pentru imunizarea șoarecilor. Serul obținut de la animale imunizate a fost examinat printr-un test bactericid corelat cu nivelul protecției oferite. Procesul a condus la identificarea a trei antigene necunoscute anterior, comune mai multor tulpini MenB. Primul vaccin universal împotriva MenB este compus din proteina de legare a factorului H (fHbp), antigenul de legare heparină *Neisseria* (NHBA), adezina A *Neisseria* (NadA), combinate cu vezicule de membrană exterioară (*outer membrane vesicle* OMV) (Masignani şi colab. 2019).

8.2.8. Vaccinologia structurală

Noile perspective structurale asupra învelişului viral, conformației proteinelor și epitopilor antigenici pot ghida proiectarea de noi vaccinuri împotriva virusurilor infecţioase cum ar fi HIV, virusul hepatitei C, enterovirusul A71 și virusul Dengue. Anticorpii pot oferi imunitate sterilizantă împotriva agenților patogeni virali, iar identificarea anticorpilor robuști împotriva mai multor tulpini virale este un deziderat. Odată ce astfel de anticorpi sunt identificați și izolați, elucidarea structurală a epitopilor lor poate dezvălui regiuni de pe suprafața virală care pot fi vizate de vaccinuri și imunoterapie. Cartarea unui număr mare de epitopi şi mai nou a răspunsului anticorpilor policlonali se poate realiza cu ajutorul microscopiei electronice. Studiile structurale au dezvăluit că anticorpii utilizează strategii multiple pentru a recunoaște o gamă largă de suprafețe și locații epitopice pe antigenele virale, identificându-se astfel punctele slabe de pe armura virală (Murin şi colab. 2019).

Abordarea tridimensională oferă informații esențiale despre structura terțiară și poziția epitopilor virali. Aceste informații detaliate pot fi exploatate pentru a rezolva unele dintre problemele dificile care împiedică dezvoltarea vaccinurilor. Vaccinologia structurală este o abordare rațională pentru a genera un vaccin eficient care implică:

A. Determinarea structurii atomice a antigenului sau a complexului antigen-anticorp;
B. Remodelarea antigenului sau a epitopului prin inginerie moleculară inversă;
C. Încorporarea antigenului sau epitopului remodelat într-o platformă de vaccin;
D. Testarea *in vivo* a siguranței și eficacității vaccinului candidat (Anasir şi Poh 2019).

Astfel, obţinerea unui vaccin cu epitopi multipli împotriva unui virus, implementând tehnicile de nouă generaţie se poate realiza *in silico* şi presupune următoarele etape:

1. Identificarea şi selecţia proteinelor virale responsabile de virulenţă, obţinerea secvenţelor şi analiza filogenetică a acestora;

2. Predicţia epitopilor ce induc activarea limfocitelor T citotoxice, a limfocitelor T helper şi secreţia IFNγ, a epitopilor ce induc activarea limfocitelor B, a andocării acestora la MHC I şi II şi realizarea constructului multiepitop;
3. Predicţia şi validarea structurii terţiarea a moleculei candidat, predicţia antigenităţii şi reactivităţii alergenice, a proprietăților fizico-chimice;
4. Determinarea *in silico* a andocării moleculare la receptorii TLR2, TLR4, MHC I şi MHC II;
5. Simularea dinamicii moleculare a constructului;
6. Traducerea inversă şi optimizarea codonilor;
7. Clonarea *in silico* şi screeningul imunogenităţii utilizând algoritmi bioinformatici (Kar şi colab. 2020).

8.2.9. Vaccinuri cu peptide sintetice

O abordare alternativă a imunizării este identificarea secvențelor peptidice care declanșează un răspuns imun protector și utilizarea versiunilor complet sintetice ale acestora ca substanță vaccinală. Deoarece sunt sintetice, nu există riscul de mutație sau reversiune, nici riscul de contaminare cu substanțe patogene sau toxice, iar manipularea chimică a structurii peptidice ar putea crește stabilitatea și ar reduce efectele secundare nedorite observate în secvența nativă. Numărul de antigene pregătite în acest fel ar putea înlocui microorganismele greu cultivabile. Conformaţia sintetică ar putea expune părți ale antigenului care nu sunt detectate de sistemul imunitar în timpul infecției naturale. Prin secvențierea genomului noilor tulpini și serotipuri de microorganisme, antigenele peptidice ar putea fi modificate rapid pentru a genera răspunsuri specifice tulpinii. Cu toate acestea, abordarea nu este lipsită de dificultăți practice și teoretice. Adesea, epitopul antigenic nu este o simplă secvență de aminoacizi, ci o structură compusă din diferite părți ale secvenței de proteine care se reunesc pentru a construi o structură tridimensională. Modelarea acestor structuri va fi necesară pentru a genera sintetic situsul antigenic corect. Peptidele sintetice pot fi liniare sau ciclice, molecule multiantigenice şi peptide conjugate cu proteine. În dezvoltare se află un vaccin cu toxina difterică, antimalaric, antigripal H1N1 etc.

8.2.10. Vaccinuri cu celule prezentatoare de antigen

Producția și utilizarea clinică a celulelor prezentatoare de antigen (*antigen presenting cells*, APC) este o metodă recent investigată ca imunoterapie oncologică, tehnica fiind acum exploatată în contextul pandemiei COVID-19. APC reprezintă o componentă esențială în răspunsul sistemului imunitar la vaccin. Aceste celule specializate includ celule dendritice, monocite, macrofage şi constituenţi ai sistemului monocit-macrofag. Limfocitele B, care captează antigenul prin intermediul imunoglobulinelor de membrană pot de asemenea să funcţioneze eficient ca APC pentru limfocitele T, prin prezentarea antigenului degradat (oligopeptidă) legat de moleculele MHC. Caracteristica definitorie a APC este exprimarea MHC I şi II pe suprafaţa lor, precum şi a moleculelor accesorii necesare pentru activarea limfocitelor T. Imediat după activare, APC pot secreta citokine care induc funcţii specifice în celulele cărora le prezintă antigenul.

Încărcarea APC cu peptide care ar urma să fie produse prin vaccinare ocolește primele etape în generarea răspunsului imun. În mod tradițional, celulele dendritice sunt recoltate de la individ,

manipulate pentru a prezenta antigenul dorit și injectate înapoi subiectului, ca autovaccin. Aceste manevre sunt prohibitive din punct de vedere al costurilor și consumă prea mult timp pentru un vaccin desfășurat pe scară largă. Acest lucru a condus la dezvoltarea celulelor artificiale care prezintă antigen, unde linii de celule imortalizate sunt transduse cu lentivirusuri pentru a imita în mod eficient APC. Astfel de vaccinuri în dezvoltare sunt candidaţii COVID-19/aAPC şi LV-SMENP-DC (Shenzhen Geno-Immune Medical Institute), care conţin celule dendritice prezentatoare de antigene. Pe baza secvenţei genomului SARS-CoV-2, domenii conservate ale proteinelor structurale și ale proteazelor au fost selectate pentru a proiecta minigene lentivirale pentru exprimarea antigenelor SARS-CoV-2 şi a unor imunomodulatori. Condiţiile stricte de stocare ale vaccinurilor pe bază de celule și limitările procedurilor de administrare împiedică dezvoltarea acestor vaccinuri pe scară largă, cu atât mai mult cu cât sunt necesare doze multiple pentru a se obţine un răspuns imun eficient (van Riel şi de Wit 2020).

8.3. Formularea vaccinurilor

Formularea vaccinului reprezintă o parte importantă a procesului general de dezvoltare pentru producerea, testarea și aprobarea noilor candidați la vaccin. Formularea de vaccin poate fi definită drept convertirea antigenelor vaccinului în medicamente, în care forma de dozare comercială nu numai că menține potența și stabilitatea în timpul fabricării și depozitării, dar este, de asemenea, concepută pentru a fi administrată convenabil pacienților. Dezvoltarea şi optimizarea formulării vaccinului de la descoperirea moleculei imunogene până la realizarea unui vaccin utilizabil include:

1. Caracterizarea fizică și chimică a componentei antigenice;
2. Dezvoltarea testelor care indică stabilitatea și potența;
3. Evaluarea și optimizarea căii de administrare și a adjuvanților;
4. Proiectarea formulării pentru a maximiza stabilitatea vaccinului candidat (antigen și adjuvant), durata de valabilitate și potențialul imunogen (Kumru şi colab. 2014).

Adjuvanţii

Sunt substanţe sau amestecuri de substanţe care au proprietatea de a creşte eficienţa unor complexe medicamente-adjuvanţi farmaceutici, sau a unor antigene-adjuvanţi imunologici. Vaccinurile nereplicative (vaccinuri cu germeni inactivaţi, subunitare, recombinate) conţin adjuvanţi cu rol de intensificare a acţiunii imunostimulante. Astfel de adjuvanţi sunt geluri apoase, de $Al(OH)_3$, emulsii uleioase etc. Antigenul este adsorbit pe suprafaţa moleculelor sau agregatelor moleculare şi este eliberat gradat în ţesuturi. Cel mai cunoscut este adjuvantul Freund, un amestec de emulgator vegetal ce conţine ulei de arahide, iar în formula completă mai conţine şi o suspensie de bacili tuberculoşi omorâţi prin căldură.

Timp de mai bine de șapte decenii, sărurile de aluminiu au reprezentat singurul adjuvant inclus în vaccinurile autorizate (împotriva hepatitei B, difteriei, tetanosului și tusei convulsive sau HPV). La sfârșitul anilor 1990 a fost introdus adjuvantul MF59, inclus pentru prima dată într-un vaccin autorizat în Europa (antigripal). Ulterior alți patru adjuvanți au fost dezvoltaţi şi incluşi în

formularea vaccinurilor: AS01 (Shingrix şi Mosquirix), AS04 (Fendrix și Cervarix), AS03 (Pandemrix și Arepanrix) și citozin fosfoguanozină (CpG) 1018 (Heplisav-B). MF59 (Novartis) este un adjuvant organic, o emulsie ulei-apă ce conţine scualen şi doi surfactanţi, Tween 80 şi Span 85. Adjuvanţii sistemului AS0 dezvoltat de GSK reprezintă combinaţii raţionale de molecule clasice (săruri de aluminiu, emulsii şi liposomi): AS03 este similar MF59 dar conţine suplimentar α-tocoferol (vitamina E); AS04 conţine lipidul monofosforil A (MPLA) şi lipopolizaharide detoxifiate de la *Salmonella minnesota* adsorbite pe săruri de aluminiu; AS01 conţine MPLA, şi saponina vegetală QS21 de la *Quillaja saponaria* Molina (Pulendran şi colab. 2021). Dezvoltarea s-a bazat pe observaţia că agonişti specifici ai receptorilor Toll-like (TLR) ar putea constitui molecule ideale pentru a fi exploatate ca adjuvanți în vaccinurile de nouă generație, vizând în special îmbunătățirea imunogenității la pacienţi de vârste extreme. Un exemplu este MPLA, agonist specific al TLR 4, adsorbit pe săruri de aluminiu (Finco şi Rappuoli 2014; Kumar şi colab. 2019). În cazul vaccinurilor ADN, secvenţele plasmidiale care conţin motive deoxicitidilat-fosfat-deoxiguanilat (CpG) funcționează ca un adjuvant încorporat. Adjuvanţii Ribi sunt emulsii ulei-apă ce conţin Polisorbat 80 cu rol surfactant, compuşi de la micobacterii şi MPLA. Adjuvanţii Titermax, o nouă generaţie de adjuvanţi netoxici, sunt mixturi de copolimeri neionici polioxipropilenă şi polioxietilenă.

Citokinele potenţează efectul imunomodulator iar includerea genelor pentru IL-12, IL-2, IL-15, interferon α etc în vaccinurile ADN a permis testarea acestora ca adjuvanţi în aşa-numitele cocktailuri de vaccin (Suschak şi colab. 2017). Unele sisteme de livrare la ţintă au şi rol de adjuvanţi: protamine, particule nanolipidice, particule polizaharidice, polimeri cationici, nanoparticule conjugate cu PEG etc.

Un sistem inovator de cedare la ţintă este platforma de livrare bazată pe nanolipide, fără elemente apoase în formularea finală a vaccinului, brevetat de compania IMV Inc. Platforma DPX poate fi formulată cu antigene peptidice, iar mecanismul său unic de acțiune fără eliberare permite ca celulele prezentatoare de antigen (APC) să fie atrase de locul injectării, facilitând un răspuns imun robust și susținut în ganglionii limfatici. Această tehnologie utilizează un mecanism de acțiune inovativ care permite programarea *in vivo* a celulelor sistemului imunitar, direcționată către producerea de noi terapii sintetice potente. IMV Inc. încearcă să dezvolte prin platforma DPX candidaţi pentru vaccin terapeutic al cancerului ovarian avansat, precum și pentru combaterea COVID-19 (Mirzaei şi colab. 2020).

Conservanţii

Se adaugă diferiţi agenţi antimicrobieni cu rol conservant: fenol, tiomersal (foarte rar se mai foloseşte). Unii din adjuvanţi şi conservanţi sunt responsabili de reacţii adverse.

Agenţii stabilizatori

Condiţiile de stres la care sunt supuse moleculele antigenice în timpul etapelor de producţie (temperatură scăzută, separări de fază, modificări ale pH-ului și puterii ionice și formarea cristalelor de gheață) necesită, după caz, prezența unor aditivi stabilizatori în formulare pentru a preveni sau minimiza efectele dăunătoare asupra stabilității și potenței vaccinului. Exemple: agenţi crioprotectori, soluţii tampon, excipienţi stabilizatori etc.

Stabilitatea vaccinurilor

Vaccinurile trebuie menţinute la temperatura recomandată de producător, de la fabricare până la administrare. Orice expunere la condiţii improprii conduce la pierderea potenţei, iar **aceasta nu mai poate fi restabilită**. Stocarea vaccinurilor tradiţionale, formulate sub formă lichidă, cu sau fără adjuvanţi, se realizează la o temperatură de 2-8ºC. Unele formule de vaccin pot fi stocate şi la temperatura camerei, producătorii recomandând un nivel de sensibilitate (20, 27, 37 sau chiar 45ºC) şi perioada maximă ce conduce la inactivarea vaccinului (de la 6 ore la 3 luni). Congelarea acestor produse este interzisă, iar refrigerarea se realizează în unităţi compacte destinate produselor biologice, utilizarea unor combine frigorifice fiind improprie. Unele vaccinuri liofilizate, cum sunt de regulă cele vii atenuate, se păstrează în condiţii de refrigerare, iar altele prin congelare la -20ºC (Kumru şi colab. 2014). Pentru a-şi menţine potenţa, vaccinurile de ultimă generaţie, cum sunt cele cu nanoparticule, pot necesita temperaturi ultrascăzute de stocare. Spre exemplu, vaccinul candidat BNT162 necesită stocare la -70ºC, iar prin decongelare se degradează în 5 zile.

Administrarea vaccinurilor

Răspunsul imunologic este dependent de ruta de administrare. Imunizarea parenterală induce imunitatea sistemică, iar imunizarea pe calea mucoaselor poate fi utilizată deoarece induce atât imunitate mucozală cât şi sistemică. Mucoasele sunt calea de pătrundere în organism a multor agenţi patogeni.Vaccinurile se administrează în una sau mai multe doze (doza iniţială şi rapel):

- Intramuscular: vaccinul împotriva hepatitei A, hepatitei B, DTP, Hib, antigripal şi antipoliomielitic injectabil;
- Subcutanat: vaccinul ROR, antivaricelic şi antipoliomielitic injectabil;
- Spray nazal: vaccinul antigripal;
- Picături orale: vaccinul antirotavirus, antipoliomielitic oral.

Nu există disponibil comercial niciun vaccin cu administrare intravenoasă, însă cercetătorii de la Institutul Pasteur au publicat rezultatele unui studiu clinic privind siguranţa, imugenicitatea şi eficacitatea primului vaccin antimalaric care a fost administrat intravenos, prin injectarea sporozoiţilor atenuaţi de *Plasmodium malariae* – PfSPZ (Seder şi colab. 2013; Butler 2019)

8.4. Perspective ale vaccinării

Fiecare ţară îsi stabileşte propriul sistem de profilaxie printr-o schemă de vaccinare adaptată specificului epidemiologic din regiunea respectivă (**Tabel 8-9**), şi realizează o monitorizare a cazurilor de îmbolnăvire. Raportul incidenţei bolilor cu profilaxie prin vaccinare, inclusiv pentru ţara noastră, este disponibil pe pagina WHO: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/incidences?c=ROU. Monitorizarea infecţiilor se realizează în context epidemiologic şi terapeutic. O serie de infecţii contractate congenital sau perinatal pun în pericol dezvoltarea normală a fătului şi chiar viaţa acestuia. În acest sens se recomandă efectuarea de către gravide a panelului de teste TORCH, ce reprezintă

screeningul pentru: toxoplasmoză, alte infecţii (ex. sifilis, hepatita B, infecţia cu enterovirus, virusul Epstein-Barr, virusul varicelo-zosterian, parvovirusul B19, virusuri Coxsackie, HIV, virusul Zika etc), rubeolă, citomegaloviroză şi infecţie cu virusul *Herpes simplex*.

Tabel 8. Schema naţională de vaccinare în România.

Vârsta	Vaccin	Descriere vaccin
primele 24h	HEP-B	Vaccin anti-hepatită B
2-7 zile	BCG	Vaccin anti-tuberculoză
2 luni	1. DTPa + VPi + Hib + HEP B 2. Vaccin pneumococic conjugat	DTPa = vaccin anti-diftero-tetano-pertussis acelular (împotriva difeteriei, tetanosului şi tusei convulsive)
		VPi = vaccinare anti-polio (împotriva poliomielitei, injectabil)
		Hib = vaccin anti-*Haemophillus influenzae* de tip b
		HEP B = vaccin anti-hepatita B
		Vaccin anti-pneumococic = împotriva otitei, meningitei, pneumoniei pneumococice
4 luni	1. DTPa + VPi + Hib +HEP B 2. Vaccin pneumococic conjugat	DTPa = vaccin anti-diftero-tetano-pertussis acelular
		VPi = vaccin anti-polio
		Hib = vaccin anti-*Haemophillus influenzae* de tip b
		HEP B = vaccin anti-hepatită B
		Vaccin anti-pneumococic
11 luni	1. DTPa + VPi + Hib +HEP B 2. Vaccin pneumococic conjugat	DTPa = vaccin anti-diftero-tetano-pertussis acelular
		VPi = vaccin anti-polio
		Hib = vaccin anti-*Haemophillus influenzae* de tip b
		HEP B = vaccin anti-hepatită B
		Vaccin anti-pneumococic
12 luni*	ROR	Vaccin anti-rubeolă, anti-rujeolă şi anti-oreion (*9 şi 12 luni în caz de epidemie)
5 ani	ROR	Vaccin anti-rubeolă, anti-rujeolă şi anti-oreion
6 ani	VPi (copiii vaccinaţi DTPa la 4 ani) DTPa+VPi (copiii care NU au fost vaccinaţi DTPa la 4 ani)	VPi = vaccin anti-polio
		DTPa = vaccin anti-diftero-tetano-pertussis acelular
		VPi = vaccin anti-polio
7 ani	ROR	Vaccin anti-rubeolă, anti-rujeolă şi anti-oreion
8 ani	VPi (valabil pentru copiii vaccinaţi la 4 ani cu DTPa)	Vaccin anti-polio
14 ani	DT pentru adulţi/ DTPa	Vaccin antidifteric şi antitetanic
24 ani	DT	Vaccin antidifteric şi antitetanic (ulterior, la fiecare 10 ani)

Tabel 9. Vaccinuri opţionale în România.

Vârsta	Vaccin opţional
2-3 luni	Vaccin anti-rotavirus (doza 1), împotriva gastroenteritei acute, oral
4-5 luni	Vaccin anti-rotavirus (doza 2), împotriva gastroenteritei acute, oral
9 luni	Vaccin antivaricelic (două doze la distanţă de 6 săptămâni, după vârsta de 9 luni)
11 luni	Vaccin pneumococcic conjugat (doza 3), în funcţie de stocurile oferite de Ministerul Sănătăţii
15 – 18 luni	Vaccin împotriva hepatitei A, doza 1 (minim 3 luni de la ROR)
21 – 24 luni	Vaccin împotriva hepatitei A, doza 2 (rapel la minim 6 luni de la prima doză) Vaccin antimeningococic
11 – 18 ani	Vaccin anti-HPV (1 doză, administrat doar fetelor la 14/18 ani sau femeilor neimunizate aflate la vârsta fertilă)
Anual	Vaccin antigripal
În pandemia COVID-19	Vaccin anti-SARS-CoV-2

În ciuda eforturilor globale de profilaxie şi terapie, se constată o emergenţă a bolilor infecţioase, în special de origine zoonotică, dar şi o reapariţie a unor agenţi infecţioşi străvechi. În ultimele decenii, un număr de virusuri zoonotice generează serioase amenințări la adresa sănătății globale și a economiei la nivel mondial. Virusuri infecțioase extrem de periculoase pentru om pot fi

transmise de ţânţari (West Nile, Zika, Dengue, Chikungunya, febrei galbene, encefalitei japoneze), lilieci (Ebola, Nipah, coronavirusurile SARS-CoV şi SARS-CoV-2), rozătoare (Lassa, hantavirus) etc. Boala cauzată de Coronavirus 2019 (COVID-19) constituie un exemplu de zoonoză care s-a răspândit pe tot Globul, cu un impact semnificativ asupra sănătății publice. Comunitatea științifică este astfel mai solicitată ca oricând pentru o intervenție rapidă în prevenirea și tratarea infecțiilor emergente (Trovato şi colab. 2020). Perspectivele vaccinării includ:

- Identificarea și utilizarea unor noi agenţi imunogeni – dezvoltarea de vaccinuri pentru bolile pentru care nu există vaccinuri disponibile (infecţii cu virusurile West Nile, Lassa, Nipah, Chikungunya, Zika, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 etc);
- Dezvoltarea unor vaccinuri multivalente împotriva mai multor agenţi patogeni şi vaccinuri universale, care să protejeze împotriva tuturor tulpinilor unui agent patogen, indiferent de subtip, variabilitate genetică ori antigenică (de ex. antigripal);
- Folosirea de imunomodulatori în vaccinuri pe bază de vectori: insule CpG și citokine (interleukine, factori de stimulare a hematopoiezei, interferoni, factori de necroză tumorală, factori de creștere, factori supresori);
- Utilizarea tehnicilor de ultimă generaţie: vaccinologie inversă, structurală, cu proteine sintetice, cu ARNm;
- Dezvoltarea de metode de livrare la ţintă: plasmide, vectori virali, liposomi, nanolipide etc;
- Metode de administrare prietenoase prin sisteme care permit vaccinarea în masă fără injectare: oral, intranazal;
- Creşterea stabilităţii vaccinurilor, păstrare la temperatura ambiantă;
- Exprimarea unor proteine străine în plante şi dezvoltarea vaccinurilor comestibile;
- Elaborarea de vaccinuri pentru agenții non-infectioşi: pentru controlul și prevenţia cancerului, vaccinuri pentru a induce contracepţia de lungă durată, împotriva adicţiilor;
- Realizarea unor vaccinuri terapeutice personalizate (cu APC) la costuri rezonabile.

8.4.1. Oncovaccinuri

Vaccinurile anticancer sunt medicamente ce stimulează răspunsul imun pentru a neutraliza agenţii patogeni sau celulele canceroase. Vaccinurile profilactice și terapeutice reprezintă o abordare interesantă în tratamentul oncologic multidisciplinar. Vaccinurile profilactice acţionează preventiv, prin mecanismele specifice vaccinurilor antiinecţioase, neutralizând agentul patogen şi oferind protecţia imunitară. Vaccinurile terapeutice stimulează capacitatea sistemului imunitar de a găsi și distruge antigene specifice ori antigene asociate cancerului, pe care celulele sănătoase nu îi au. Imunoterapia tumorală poate fi clasificată, în general, ca pasivă (adaptativă), constând în administrarea de celule sau anticorpi dezvoltaţi *ex vivo*, şi activă, reprezentată de vaccinuri. Comparativ cu toate celelalte modalități (chirurgie, chimioterapie, radioterapie și imunoterapie adaptivă), un răspuns imun eficient bazat pe vaccin poate fi singurul tratament pentru cancer cu potențialul unui efect durabil, pentru toată viața.

Una dintre problemele majore în dezvoltarea unui vaccin eficient împotriva cancerului este lipsa antigenelor tumorale specifice și răspunsul imun slab împotriva antigenelor asociate tumorii, recunoscute de obicei de sistemul imunitar ca auto-antigene (*self*). În ultimele decenii, s-au propus

diferite strategii pentru vaccinurile terapeutice împotriva cancerului: vaccinuri pe bază de celule, vaccinuri ADN sau ARN, vaccinuri cu proteine sau peptide și vaccinuri pe bază de vectori virali. Rațiunea comună pentru toate aceste modalități este activarea celulelor prezentatoare de antigen și stimularea unui răspuns imun mediat al limfocitelor T citotoxice specifice antigenului. Unele vaccinuri împotriva cancerului sunt personalizate.

Oncovaccinurile terapeutice pot fi concepute în mai multe moduri. Cel mai adesea, antigenţii tumorali pot fi încărcați direct pe celulele prezentatoare de antigen ale sistemului imunitar, precum celule dendritice transfectate *ex vivo*, care sunt apoi reinjectate pacientului. Pot fi administrate în combinație cu alte molecule de natură virală ori bacteriană sau cu alte substanțe cu rol adjuvant care stimulează sistemul imunitar. Celulele dendritice se deplasează către ganglionii limfatici pentru a iniția și activa celulele T, astfel încât să poată ataca celulele canceroase care exprimă antigenele tumorale. Există câteva limitări ale acestei metode, întrucât celulele dendritice sunt fragile şi supraviețuiesc în număr insuficient după injectarea la pacienți. O nouă metodă dezvoltă vaccinuri personalizate pe bază de neoantigene, care sunt antigene codificate de gene mutante specifice tumorii. Folosesc peptide lungi ca antigene, împreună cu un adjuvant pentru a stimula un răspuns imun *in vivo*.

Producția și utilizarea clinică a celulelor prezentatoare de antigen artificial APC este o metodă recent investigată ca imunoterapie oncologică. Candidatul principal al IMV Inc., DPX-Survivac, este o imunoterapie bazată pe activarea celulelor T combinată cu survivin, o proteină inhibitor de apopotoză, evaluat în cancerul ovarian avansat.

Oncovaccinuri terapeutice aprobate pentru comercializare:

- **Oncophage** sau **Vitespen** (Antigenisc Inc.) este un vaccin împotriva cancerului renal, melanomului şi a gliomului. Este un tratament personalizat, realizat prin extragerea din celulele tumorale a proteinei de şoc termic gp96 şi a peptidelor asociate.
- **Sipuleucel-T** (Provenge, Dendreon Pharmaceuticals) vaccin autolog cu celule modificate cu o proteină de fuziune, împotriva cancerului de prostată.
- **CimaVax-EGF** (Centrul de Imunologie Moleculară, Cuba) este un oncovaccin împotriva cancerului pulmonar cu celule non-mici. Se bazează pe imunizarea cu factorul de creştere epidermică (EGF), o proteină ce stimulează creşterea şi diferenţierea celulară. Conţine EGF recombinat, o proteină de la *Neisseria meningitidis* şi Montanide ISA51 ca adjuvant.

În stadii avansate se află **rilimogene galvacirepvec/rilimogene** glafolivec (Prostvac, Bavarian Nordic), ce utilizează poxvirusuri recombinate pentru a exprima antigenele specifice tumorii de prostată împreună cu trei tipuri de molecule imunostimulatoare.

Vaccinuri împotriva HBV

Se apreciază că infecţiile produse de oncovirusuri (HBV, HPV) sau oncobacterii (precum *Helicobacter pylori* şi altele, vezi subcapitolul Produse bioterapeutice vii) reprezintă cauza a 20% din totalul cancerelor. Virusul hepatitei B este un virus ADN ce afectează hepatocitele, iar îmbolnăvirea poate conduce la ciroză şi cancer hepatic. Vaccinul împotriva HBV este considerat primul oncovaccin. În România, începând cu anul 1994, vaccinarea copiilor se efectuează în primele 24 de ore de la naştere, urmată de două doze de rapel.

Lansat în 1981, primul vaccin împotriva HBV a fost produs prin recoltarea antigenului de suprafață al hepatitei B (HBsAg) din plasma persoanelor cu infecție cronică cu HBV. Antigenele au fost înalt purificate și orice particule infecțioase reziduale au fost inactivate prin tratare cu uree, pepsină, formaldehidă şi căldură. A existat o reticenţă pentru vaccinurile derivate din plasmă, datorită îngrijorării cu privire la transmiterea unor agenți patogeni, inclusiv HIV. Deşi s-au dovedit a fi nefondate, acestea au împiedicat acceptarea vaccinului în unele populaţii. Prin urmare, s-au depus eforturi sporite în cercetare pentru dezvoltarea un vaccin recombinat, care a fost aprobat pentru comerciaizare în anul 1986. Mai multe vaccinuri anti-HBV sunt disponibile pe piaţă: Recombivax HB (Merck), Engerix B (GSK), Twinrix (GSK) împotriva HAV şi HBV, Pediarix (GSK) antitetanos-pertussis-hepatitei B şi a poliomielitei etc.

În plus, sunt testate vaccinuri candidat pe bază de proteine recombinate, VLV (vezi secţiunea Vaccinuri cu vezicule asemănătoare virusului) şi VLP exprimate în plante, cu administrare orală sau nazală. Compusul Sci-B-Vac (candidatul VBI-2601 dezvoltat de VBI Vaccines şi Brii Biosciences), comercializat în Israel, aşteaptă aprobarea EMA. Este un vaccin de generaţia a treia, derivat din linii CHO. Conţine trei tipuri de antigene HBV recombinate (S, pre-S1 şi pre-S2), fiind formulat pentru a viza atât imunitatea celulelor B, cât și a celulelor T prin multiple mecanisme de acțiune, inclusiv neutralizarea virusului circulant, blocarea infecției hepatocitelor, permițând eliminarea mediată imun a hepatocitelor infectate cu HBV.

Vaccinuri împotriva HPV

Papilomavirusul uman este un virus ADN cu peste 170 de tulpini, dintre care HPV16 şi HPV18 reprezintă cea mai frecventă cauză a cancerului cervical, iar infecţiile cu tulpinile HPV6 şi HPV11 sunt asociate papiloamelor genitale şi cancerului laringeal. Vaccinurile împotriva HPV oferă protecţie împotriva mai multor tulpini virale. Două produse sunt disponibile pe piaţă şi cuprinse în schema naţională de vaccinare din România (Gardasil, Merck şi Cervarix, GSK). Sunt vaccinuri recombinate, conţinând particule asemănătoare antigenelor HPV (VLP asemănătoare proteinei L1) produse în celule de *Saccharomyces cerevisiae* şi respectiv în linia de celule High Five de la molia *Trichoplusia ni*. Alte vaccinuri candidat au scopul de a asigura o imunitate largă împotriva mai multor tulpini ale HPV. Astfel, unele ţintesc suplimentar regiuni ale proteinei L2 din capsida virală.

Noi vaccinuri terapeutice anti-HPV aflate în testare pot fi grupate în cinci categorii: pe bază de peptide, pe bază de proteine recombinate, vaccinuri ADN, vaccinuri cu vectori virali și pe bază de celule dendritice. Sunt evaluate pentru potențialul lor de a stimula sistemul imunitar și de a genera un răspuns citotoxic celular împotriva țesutului sau tumorii infectate cu HPV. Studiile clinice au demonstrat eficacitate clinică semnificativă și răspunsuri sistemice ale celulelor T citotoxice specifice HPV, în special atunci când virusul recombinat al vaccinului este administrat direct în leziuni. Un vaccin candidat cu şanse mari de aprobare este VGX-3100 (Inovio), vaccin terapeutic ADN care constă din plasmidele pGX3001 și pGX3002. Dezvoltat ca o alternativă imunologică la intervenția chirurgicală, se administrează intramuscular cu ajutorul unui dispozitiv de electroporare. Dispozitivul Cellectra (Inovio) folosește impulsuri electrice scurte pentru a deschide reversibil pori mici în membrana celulară, ceea ce permite pătrunderea plasmidelor ori a ARNm.

8.4.2. Vaccinul antigripal universal

Se estimează că epidemiile de gripă sezonieră cauzează între 3 şi 5 milioane de îmbolnăviri severe anual. Gripa este cauzată preponderent de virusul gripal A (*Influenza A virus*, IAV) și de virusul gripal B (*Influenza B virus*, IBV). Ambele sunt virusuri ARN nude, IAV având mai multe tulpini diferite. Există două motive principale pentru care este nevoie de vaccinare antigripală sezonieră: tulpinile de gripă se modifică anual şi eficacitatea vaccinului antigripal este limitată și de scurtă durată. Vaccinarea anuală împotriva gripei sezoniere oferă în prezent o protecție îngustă, doar împotriva unor tulpini selectate ale virusului. Vaccinul antigripal actual este fie trivalent, fie tetravalent. Vaccinul trivalent conține antigene ale tulpinilor H1N1, H3N2 și o tulpină a IBV, iar vaccinul tetravalent include atât tulpini de linie Yamagata, cât și Victoria pentru IBV. Tulpinile conținute în vaccinul antigripal sezonier sunt actualizate anual pentru a le include pe cele prognozate să circule în următorul sezon gripal. Deși vaccinul antigripal actual este eficient în reducerea morbidității și mortalității cauzate de infecțiile gripale sezoniere, eficacitatea vaccinului este estimată la doar 10 - 60%. Un vaccin antigripal universal are scopul asigurării unei protecții mai largi și mai durabile împotriva gripei. O varietate de tehnologii ale vaccinologiei au condus la dezvoltarea mai multor candidați pentru un vaccin antigripal universal, 27 de vaccinuri candidat aflându-se în studii clinice între 2010-2019 (Corder şi colab. 2020).

Deși s-au făcut multe progrese în dezvoltarea acestor vaccinuri, cercetătorii mai au de eliminat obstacole pentru a îmbunătăți eficacitatea vaccinului. Criteriile desemnate pentru un vaccin antigripal universal:

- Să aibă o eficienţă de cel puțin 75%;
- Să protejeze împotriva IAV din grupele I și II;
- Să ofere o protecție durabilă pentru cel puțin 1 an;
- Să fie potrivit pentru toate grupele de vârstă.

Peplosul virusului gripal conține proteinele hemaglutinină (HA) și neuraminidază (NA), importante pentru intrarea și respectiv eliberarea virionilor din celulele infectate. Există 18 tipuri cunoscute de hemaglutinină și 11 tipuri cunoscute de neuraminidază, deci, teoretic, sunt 198 de posibile combinații diferite ale acestor proteine. Alte componente structurale ale virusului, cum ar fi proteina M1 a matricei de legare a ARN, nucleoproteina (NP) care acoperă ARN-ul viral sau proteina M2 a canalului ionic, pot fi recunoscute de către sistemul imunitar. HA și NA sunt mai numeroase și accesibile pe învelișul viral și, prin urmare, sunt ținte accesibile pentru anticorpi. Răspunsul imunitar este de obicei specific tulpinii de gripă care provoacă infecția, deoarece majoritatea anticorpilor neutralizanți generați fie de infecție, fie de vaccinare, vizează ceea ce este cunoscut sub numele de capul globular al HA. Mutațiile aleatorii în genomul IAV generează variabilitatea capului globular al HA, proces cunoscut sub numele de derivă antigenică. Anticorpii care recunosc o tulpină a virusului gripal nu vor proteja împotriva unei noi variante. Schimbarea antigenică rezultă în urma recombinării a două tulpini diferite ale virusului în aceeași gazdă infectată, şi poate produce un HA complet nou. Astfel de schimbări antigenice au provocat tulpini pandemice de gripă, precum focarul cu tulpina H1N1 din 2009. Un alt motiv pentru care este necesară vaccinarea anuală împotriva gripei este acela că eficacitatea vaccinului scade la 180 de zile după vaccinare, sugerând un răspuns imun în declin în 6 luni de la vaccinare.

Strategiile pentru obţinerea unui vaccin antigripal universal includ:

1. Proteinele HA:

- Utilizarea unor regiuni conservate din „pedunculul” HA ca ţinte ale vaccinului, implicând proteine recombinate cărora le lipseşte partea globulară al moleculei HA. Compusul candidat al Vaxart Inc. este un vaccin cu vector adenoviral ce exprimă proteine HA, formulat sub formă de tablete cu administrare orală.
- Exprimarea unor proteine HA recombinate ori himerice, obţinute prin fuzionarea unui peduncul de la o tulpină gripală umană cu partea globulară a unor tulpini de gripă non-umane, împreună cu cartarea epitopilor celor mai imunogene situsuri ale pedunculului HA. Un vaccin bazat pe această abordare (GSK, colaborare) a obţinut rezultatele anticipate în studiile clinice de fază I (Bernstein şi colab. 2010).

2. M2 şi alte proteine:

- Candidatul M-001 al firmei BiondVax este probabil vaccinul antigripal universal aflat în cel mai avansat stadiu, încheind deja studiile clinice de fază III. Constă într-un compus polipeptidic liniar cu 3 repetiţii a nouă secvenţe ale M1, NP şi HA ale IVA şi IVB.
- Un vaccin cu peptide sintetice creat de Imutex conţine secvenţe ale proteinelor M1, M2 şi NP ale IVA şi IVB.
- OVX836 al companiei Osivax este un vaccin cu nanoparticule nucleoproteice ce a încheiat studiile clinice de fază II.
- Candidatul MVA+NP+M1 (Vaccitech) utilizează o platformă cu vector adenoviral şi a încheiar studiile clinice de fază II.

Există şi alţi candidaţi la vaccinul antigripal universal, aflaţi în cercetare incipientă (Corona 2020), urmând ca o soluţie preventivă să fie disponibilă în curând. Este de remarcat faptul că diversitatea gripală vizată de fiecare candidat la vaccin variază, însă doar 37% din vaccinurile universale aflate în studii clinice au fost concepute pentru a proteja atât împotriva IAV şi IBV. Unele strategii s-au concentrat pe IAV (22%) sau un singur subtip de IAV (41%). Niciun vaccin candidat nu se concentrează doar pe IBV, dar acest virus ar trebui abordat în proiectarea vaccinurilor universale antigripale. Datele indică faptul că IBV este responsabil pentru 26% din cazurile anuale de gripă, respectiv pentru majoritatea (72%) cazurilor anuale de gripă raportate la copii și adulți tineri (Corder şi colab. 2020).

8.4.3. Vaccinuri anti-SARS-CoV-2

În acest moment (ianuarie 2021), aproximativ 200 de vaccinuri candidat sunt înregistrate şi urmărite de către WHO, iar 44 se află în stadii avansate de dezvoltare, fiind testate pe subiecţi umani. Un total de 288 de studii clinice înregistrate în platforma www.clinicaltrials.gov evaluează siguranţa, eficacitatea şi imunogenitatea unor compuşi candidaţi la vaccin. Aceste vaccinuri au un obiectiv comun, și anume de a provoca răspunsul anticorpilor policlonali împotriva SARS-CoV-2 pentru a neutraliza infecția virală. Diverse abordări sunt utilizate pentru dezvoltarea compuşilor candidat la vaccin. Prin metode convenţionale sunt dezvoltate:

- Vaccin cu virus viu atenuat (în cercetare preclinică);
- Vaccin cu virus atenuat (PiCoVacc - studii clinice de fază I);
- Vaccin subunitar (NVX-CoV2373 - studii clinice de fază I şi II);

- Vaccin cu VLP (în cercetare preclinică).

Platforme de ultimă generaţie bazate pe vaccinologie inversă:

- Vaccin cu vector viral (AZD1222, Ad5-nCoV - studii clinice de fază I, II şi III);
- Vaccin ADN (INO-4800 - studii clinice de fază I);
- Vaccin ARNm (mRNA-1273, BNT162 - studii clinice de fază I, II, III);
- Vaccin cu celule prezentatoare de antigen (LV-SMENP-DC, COVID-19/aPC - studii clinice de fază I şi II) (van Riel şi de Wit 2020).

Pe lângă cele două vaccinuri aprobate, câţiva candidaţi la vaccin se află în stadii avansate de dezvoltare, în aşteptarea aprobărilor FDA şi EMA.

AZD1222 (anterior denumit ChAdOx1) dezvoltat de Universitatea Oxford şi AstraZeneca constă într-un vector adenoviral simian deficient de replicare, conținând gena glicoproteinei structurale *spike* a SARS-CoV-2, de lungime completă, cu o secvență lider activator de plasminogen tisular (tPA). Fuziunea este în ordinea N-terminal - tPA - proteină *spike* - C-terminal. Încorporarea opțională a unei secvențe lider (secvența secretorie a tPA) fuzionată la capătul N-terminal al antigenului proteinei SARS-CoV-2, este destinată să ofere imunogenitate sporită. S-a demonstrat că acest design induce absența reacțiilor de hipersensibilitate după imunizare. Un beneficiu major al acestui vaccin este inducerea răspunsului imun după o singură doză. Totuşi, administrarea unei doze suplimentare de rapel asigură o eficienţă îmbunătăţită (Folegatti şi colab. 2020).

JNJ-78436735 (sau Ad26.COV2.S) dezvoltat de Johnson&Johnson împreună cu Janssen este un vaccin monovalent compus dintr-un vector recombinat incapabil de replicare. Un adenovirus tip 26 a fost construit pentru a codifica proteina S a coronavirusului SARS-CoV-2. Vaccinul candidat ste evaluat în studii clinice de fază 3, preconizat pentru lansare pe piaţă la începutul anului 2021 (Sadoff şi colab. 2021).

Coronavac dezvoltat de Sinovac Biotech este un vaccin conţinând virus inactivat, disponibil deja în China şi în alte câteva ţări, în programe de vaccinare a categoriilor de mare risc. Vaccinul experimental pentru studii de fază 1 a fost fabricat utilizând culturi de celule, iar pentru studiul de fază 2 a fost produs în bioreactor. Celule renale de maimuță africană verde (celule Vero) au fost inoculate cu SARS-CoV-2 tulpina CN02. După incubație, virusul a fost recoltat, inactivat cu β-propiolactonă, concentrat, purificat și în final complexat prin absorbție pe hidroxid de aluminiu. Complexul a fost apoi diluat într-o soluție de clorură de sodiu, soluție salină tamponată cu fosfat și apă înainte de a fi sterilizată și filtrată, gata pentru injectare. Dozele de placebo conţin doar soluția de diluant de hidroxid de aluminiu fără virus (Zhang şi colab. 2021).

Până în prezent, doar trei vaccinuri împotriva noului coronavirus au fost aprobate, Coronavac (Sinovac Biotech) în China şi două în Rusia: Sputnik V, cunoscut anterior ca Gam-COVID-Vac, dezvoltat de Institutul de Cercetare Gamaleya din Moscova şi EpiVacCorona, dezvoltat de Centrul de Cercetare Vektor şi. Experții au exprimat îngrijorări considerabile cu privire la siguranța și eficacitatea acestor ultime două vaccinuri, dat fiind că au fost lansate înaintea efectuării studiilor clinice de fază 3.

8.5. Seruri

Seroterapia reprezintă metoda utilizării serurilor obţinute de la un bolnav sau de la un animal care are deja anticorpii specifici în sânge, cu intenţie terapeutică sau profilactică. Seroterapia conferă o imunitate pasivă, cu o acţiune limitată, de maximum 20 de zile, însă cu avantajul unei eficacităţi imediate. Injecţii cu ser se administrează mai ales pentru a neutraliza unele toxine microbiene (difterică, tetanică), pentru a neutraliza toxine ingerate (botulinică, faloidina), veninul şerpilor, pentru a atenua vaccinul antirabic etc.

Serurile terapeutice sunt biopreparate sterile obţinute din sânge recoltat de la animale cărora li s-au injectat doze crescătoare de germeni vii. Prin urmare, sângele acestor animale conţine doze mari de anticorpi heterologi, iar după coagulare, serul este bogat în anticorpi şi antitoxine. Recoltarea sângelui se face mai ales de la cal, iar prepararea serului se realizează în condiţii riguroase de asepsie. Seruruile terapeutice provin de la animale vaccinate în prealabil contra unor boli infecţioase. După inocularea la bolnav, fracţiunea proteică va furniza o imunitate pasageră, dar imediată. Principalele seruri terapeutice sunt:

- Antibotulinic
- Anticărbunos
- Antidifteric
- Antigangrenos
- Antirabic
- Antirujeolic
- Antimeningococic
- Antipneumococic
- Antipestos
- Antipiogen polivalent
- Antitetanic
- Antiveninos
- Antifaloidic
- Citotoxic antireticular.

Plasmafereza

Transfuzia cu plasma recoltată de la persoane aflate în convalescenţă este o metodă veche de combatere a bolilor infecţioase. Sângele persoanelor vindecate conţine anticorpi, iar în urma separării de restul componentelor sangvine prin centrifugare sau filtrare membranară (un proces asemănător dializei), plasma terapeutică obţinută poate ajuta sistemul imunitar al bolnavilor oferind o imunizare artificială pasivă. Plasmafereza poate fi folosită ca terapie de urgenţă sau ca terapie primară, în funcţie de afecţiune.

În pandemia cu virusul gripal H1N1 din 2009–2010, preparate de anticorpi serici obținuți prin afereză au fost utilizate pentru a trata pacienţi cu infecție severă. Persoanele tratate cu ser convalescent au manifestat o sarcină virală respiratorie redusă, răspuns seric scăzut la citokine și

rată redusă a mortalităţii. Serul convalescent a fost, de asemenea, utilizat în epidemia de Ebola din Africa de Vest din 2013. Un studiu nerandomizat în Sierra Leone a relevat o rată de supraviețuire semnificativ mai mare pentru pacienţii tratați cu sânge integral convalescent față de cei care au primit tratament standard. Au supraviețuit și doi pacienți tratați cu o combinație de ser convalescent și un medicament experimental. Dovezi nedocumentate din focarele de gripă aviară H5N1 și H7N9 atestă că utilizarea serurilor convalescente a fost eficientă, toți pacienții supraviețuind.

Serurile convalescente pot fi utilizate fie pentru profilaxia infecției, fie pentru tratamentul bolii. Profilactic, administrarea serului convalescent poate preveni infecția și bolile ulterioare la subiecţii care prezintă un risc crescut de boală, cum ar fi persoanele vulnerabile cu condiții medicale subadiacente, personalul medical și cei cu expunere la cazuri confirmate. Administrarea pasivă de anticorpi pentru prevenirea bolii este deja utilizată în practica clinică. De exemplu, pacienții expuși la HBV și la rabie sunt tratați cu imunoglobuline împotriva hepatitei B și, respectiv, împotriva rabiei umane. În plus, anticorpii pasivi sunt utilizaţi pentru prevenirea infecţiei cu RSV la sugarii cu risc ridicat. Până nu demult, a fost utilizată o globulină hiperimună policlonală preparată din probe de la donatori cu titruri serice ridicate de anticorp neutralizant RSV, dar aceste preparate au fost înlocuite acum cu palivizumab, un anticorp monoclonal murin umanizat. Utilizat terapeutic, serul de convalescență este administrat pacienţilor într-un efort de a reduce simptomele și mortalitatea. Eficacitatea acestor abordări nu poate fi dedusă fără efectuarea unor studii clinice controlate. Pe baza experienței istorice cu administrarea de anticorpi, s-a anticipat că administrarea de anticorpi ar fi mai eficientă în prevenirea bolii decât în tratamentul bolii instalate (Casadevall şi Pirofski 2020). În contextul infecţiilor cu coronavirusul SARS-CoV-2, transfuzia de plasmă terapeutică a demonstrat scăderea mortalităţii, creşterea ratei de extubare, îmbunătăţirea parametrilor de laborator şi ventilatori în comparaţie cu grupul de control (Khamis şi colab. 2020).

Administrarea de ser convalescent este uneori utilizată ca terapie adjuvantă, în diverse afecţiuni, precum: purpura trombocitopenică trombotică, miastenia gravis, neuromielita optică, scleroza multiplă, sindromul Guillain Barre, glomerulonefrita rapidă progresivă, vasculita sistemică, trombocitopenia imună, respingerea transplantului, sindromul de hipervâscozitate, anemia hemolitică autoimună, lupus eritematos sistemic sever, sindromul Goodpasture, pancreatita acută, tireotoxicoza, sindrom Lambert Eaton, crioglobulinemii, dermatomiozita, ciroza biliară primitivă, glomerulonefrita, pemfigus, sclerodermia.

9. OBŢINEREA PROTEINELOR RECOMBINATE

Aproximativ 400 de medicamente pe bază de proteine recombinate au fost aprobate în ultimele decenii, cu o creștere constantă proiectată în următorii ani. Biofarmaceuticele pe bază de proteine recombinate disponibile în UE şi SUA (fără cele a căror autorizaţie a fost revocată) includ peste 100 de anticorpi monoclonali, 17 produse din categoria interferoni, interleukine sau factori de necroză tumorală şi 27 de medicamente din categoria factori de creştere şi factori de stimulare a coloniilor, 28 de produse pe bază de factori de coagulare, 7 agenţi trombolitici şi anticoagulanţi, 63 de medicamente hormonale, 20 de vaccinuri recombinate, 3 proteine ale morfogenezei osoase, 23 de enzime recombinate, 13 proteine de fuziune. În plus, o serie de biomolecule au fost recent aprobate pentru terapia genică. Trendul de dezvoltare şi aprobare a biofarmaceuticelor este unul ascendent, multe studii clinice fiind în derulare, atât în privinţa medicamentelor inovatoare cât şi a produselor biosimilare, multe brevete expirând în perioada următoare.

Avantajele conferite de medicamentele cu proteine recombinate:

- Profil de siguranţă îmbunătățit;
- Pot furniza cantităţi suficiente de molecule esenţiale;
- Sunt disponibile o varietate de molecule pentru diferite afecţiuni;
- Au înlocuit recoltarea din cadavre şi surse animale;
- Nu implică expunerea la material genetic exogen sau vectori virali;
- Posibilitatea readministrării (concepute încât să nu genereze răspuns imun sau inflamator).

Există şi unele **dezavantaje**:

- Administrate în doze mari pot avea efecte secundare semnificative, de aceea imunogenitatea trebuie investigată;
- Durată mică de înjumătăţire la nivel tisular;
- Trebuie livrate ţintit, administrarea sistemică nu asigură biodisponibilitate la nivelul ţesuturilor/organelor vizate.

Etapele tehnologiei de producţie implică următoarele etape:

1. Identificarea şi izolarea secvenţei de ADN ce codifică proteina de interes (ADN genomic sau ARNm care este ulterior supus transcrierii inverse la ADNc cu ajutorul revers-transcriptazelor);
2. Amplificarea şi secvenţierea ADN/ADNc şi introducerea secvenţei într-un vector de exprimare care facilitează transducţia celulei ţintă;
3. Exprimarea (transcrierea şi traducerea) proteinei recombinate de către organismul/linia celulară producătoare;
4. Purificarea biomoleculei.

Metoda clasică de clonare este bazată pe tehnica reacţiei polimerazice în lanţ (PCR) şi presupune următorii paşi:

1. Extracţia şi fragmentarea enzimatică a ADN-ului genomic;
2. Inserţia fragmentelor de ADN în vectori de clonare;

3. Introducerea vectorilor recombinaţi în celule gazdă;
4. Multiplicarea celulelor transformate;
5. Screeningul bibliotecii de clone pentru identificarea celulelor transformate, care conţin ADN recombinat.

Fragmentarea ADN-ului genomic se realizează cu ajutorul endonucleaze de restricţie, astfel încât, în mod ideal, fiecare fragment să conţină o genă iar restricţia să genereze capete coezive. Transformarea genetică implică utilizarea unor vectori adecvaţi, capabili să livreze transgena în celulele gazdei: bacteriofagi, plasmide specifice bacteriilor sau drojdiilor, baculovirusuri, virusuri fitopatogene, virusuri capabile să infecteze celule animale etc. Vectorii de clonare sunt mici molecule de ADN capabile de autoreplicare (plasmide sau ADN viral), rezultând ADN recombinat. Transformarea bacteriei *E. coli* se realizează cu ajutorul plasmidelor (5-350 kb), a bacteriofagilor (fagul λ 48 kb) şi a cromosomilor bacterieni artificiali (BAC) (peste 100 kb). Frecvent utilizat este plasmidul pUC18 (2,69 kb), ce conţine o genă de rezistenţă la ampicilină (*amp*), gena *lacZ* ce codifică β-galactozidaza şi gena *lacI* ce controlează transcrierea lacZ. În cadrul lacZ (regiunea *polylinker*) este integrat un situs multiplu de clonare ce conţine situsuri pentru 13 restrictaze diferite. Regiunea *polylinker* previne exprimarea β-galactozidazei. Vectorii de clonare sunt supuşi digestiei enzimatice cu aceiaşi endonuclează, apoi incubaţi împreună cu fragmentele de ADN, iar după integrarea acestora sunt incubaţi cu ADN ligaze, enzime ce catalizează formarea punţilor fosfodiesterice şi astfel recircularizarea moleculei de ADN recombinat. Transformarea celulelor gazdă se realizează prin co-incubarea plasmidelor cu vectorii recombinaţi în soluţie de $CaCl_2$, iniţial la 0 ºC şi apoi la 42 ºC, şocul termic facilitând pătrunderea plasmidelor în celule. Screeningul pentru identificarea celulelor transformate implică inocularea pe un mediu de cultură agarizat ce conţine X-β-D-glucuronid, suplimentat cu ampicilină. În urma cultivării, doar bacteriile transformate ce conţin transgena de interes sunt capabile să dezvolte colonii lipsite de pigment albastru (Walsh 2007).

9.1 Sisteme de exprimare a proteinelor recombinate

Dezvoltarea biofarmaceuticelor pe bază de proteine recombinate este posibilă în principal datorită producției și purificării eficiente a acestora, exprimate într-o varietate de gazde procariote şi eucariote (**Tabel 10**). Multe produse disponibile comercial sunt rezultatul exprimării heterologe în diferite gazde, în special bacterii precum *E. coli* sau drojdii precum *Saccharomyces cerevisiae* şi *Pichia pastoris*. Sunt consacrate unele linii celulare de mamifere precum celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), celule renale ale puilor de hamster (BHK), celule din epiteliul renal al maimuţelor verzi (celule Vero), celule din mielom murin (NS0 sau Sp2/0), celule ale rinichiului embrionar uman (HEK), dar şi culturile celulare de insecte de la *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21) şi *Trichoplusia ni* (Tn368, High Five). Platformele transgenice nu au avut foarte mare succes în sectorul biofarmaceuticelor, fiind în continuare de perspectivă. Există câteva produse recent aprobate, rezultate ale exprimării proteinelor recombinate în plante transgenice (morcov) sau animale transgenice (capre, iepuri, găini) (Walsh 2018; Owczarek şi colab. 2019; Tripathi şi Shrivastava 2019).

Tabel 10. Sisteme de exprimare a proteinelor recombinate pentru dezvoltarea moleculelor biofarmaceutice.

Sistem de exprimare	Aplicaţii	Avantaje	Dificultăţi
Procariote: *E. coli*	Analize structurale şi funcţionale, interacţiuni, anticorpi, citokine, enzime, hormoni	Sistem scalabil, uşor de transformat, condiţii de cultură simple, timp scurt, libere de virusuri, cost redus	Solubilitatea proteinei, glicozilarea, exprimarea unor proteine umane, risc de contaminare cu endotoxine
Drojdii: *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Yarrowia lipolytica*	Analize structurale şi funcţionale, interacţiuni, anticorpi, derivaţi din sânge, enzime, hormoni	Sistem scalabil, glicozilare, condiţii de cultură simple, creştere rapidă, libere de pirogene, cost redus	Optimizarea fermentaţiei
Fungi filamentoşi: *Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger, Trichoderma reesei*	Anticorpi, enzime	Productivitate mare, condiţii de cultură simple	Frecvenţa scăzută a transformării, secreţia de proteaze ce pot degrada biomolecula, model de glicozilare, procesarea în aval (extracţia)
Alge: *Chlamydomonas reinhardtii, Dunaliella salina, Phaeodactylum tricornutum*	Endolizine, imunotoxine, antigene, anticorpi, factori de creştere, hormoni	Asamblare corectă a proteinei în cloroplaste, performanţe de producţie în fotobioreactoare, comestibile, cost atractiv	Eficienţa şi stabilitatea transformării, tehnologie în dezvoltare, platforma puţin cunoscută
Plante transgenice: morcov, tutun, cartof, porumb, orez, lucernă	Antigene, aticorpi, factori de creştere, hormoni	Asamblare corectă a proteinei, glicozilare, sistem scalabil, risc redus de contaminare, cost foarte scăzut	Timp mediu de dezvoltare, cost de purificare
Linii celulare de insecte: *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21) *Trichoplusia ni* (Tn368, High Five) *Drosophila melanogaster (S2)*	Antigene	Asamblare corectă a proteinei, transformare pentru glicozilare, sistem scalabil, risc redus de contaminare	Purificarea proteinei de contaminanţii baculovirusurilor, glicozilarea neomogenă
Animale transgenice: capre, oi, iepuri, vaci, porci, găini	Enzime, antigene, anticorpi, factori de creştere, hormoni	Productivitate şi calitate	Cost ridicat, sistem nescalabil, risc mare de contaminare
Linii celulare de mamifere: BHK, CHO, celule Vero NS0, Sp2/0 HEK	Anticorpi, derivaţi din sânge, citokine, enzime, hormoni etc	Asamblare corectă a proteinei terapeutice, model uman de glicozilare, libere de pirogene, productivitate bună, calitate înaltă	Greu de propagat, timp îndelungat, risc de contaminare (virusuri, prioni, ADN oncogen), purificare costisitoare
Sisteme acelulare (sintetice)	Proteine toxice, diverse modificări ale moleculei, studii funcţionale, interacţiuni	Sistem simplu, deschis, capabil să încorporeze componente nenaturale, exprimare rapidă	Cantităţi mici

Unul dintre cele mai studiate sisteme de exprimare genică este *E. coli*, un sistem simplu, rapid, robust, productiv și scalabil, ce are o mare varietate de vectori de exprimare disponibili. În plus, fiziologia sa a fost intens studiată şi descifrată, permițând optimizarea proceselor de producție. Cu toate acestea, procariotele prezintă anumite limitări, în principal datorită inabilităţii sau capacităţii limitate de a încorpora modificări post-translaționale în proteinele recombinate (glicozilare, fosforilare, sulfatare, procesare proteolitică etc). În unele cazuri, aceste modificări pot fi realizate prin utilizarea unor tulpini mutante sau transformate. Cu toate acestea, glicozilarea

proteinelor recombinate heterologe nu este fezabilă. În plus, componentele lipopolizaharidice ale membranei exterioare a *E. coli* (endotoxinele) constituie contaminanţi proinflamatorii. Pentru siguranţa medicamentului, acestea trebuie îndepărtate din produsul final, iar purificarea riguroasă a proteinei recombinate creşte costurile de producţie. În vederea depășirii acestei limitări sunt explorate sistemele de exprimare procariote fără endotoxine (tulpini *E. coli* LPS-mutante) și microorganismele recunoscute ca fiind sigure (GRAS, *generally recognized as safe*) precum bacteria *Lactococcus lactis*, specii de drojdii, micromicete şi microalge.

Pe lângă bacteria *E. coli* (Rosano şi Ceccarelli 2014), în continuă investigare ca platforme de producţie a moleculelor biofarmaceutice se află fungii filamentoşi (Ward 2012), microalgele (Yan şi colab. 2016; Taunt şi colab. 2017) plantele transgenice (Shanmugaraj şi colab. 2020), animalele transgenice (Bertolini şi colab. 2016), culturile celulare de insecte (Yee şi colab. 2018) şi liniile celulare de mamifere (Dumont şi colab. 2016). Limitările legate în special de ineficienţa transformărilor genetice, exprimarea defectuoasă a biomoleculelor, incapacitatea unor gazde de a efectua modificări post-translaţionale necesare activităţii terapeutice, plierea incorectă a proteinelor, dificultăţi şi costuri mari legate de procesarea în amonte sau în aval au condus la identificarea de noi sisteme de exprimare a proteinelor recombinate şi evoluţia tehnologiilor de recombinare. Sistemele de exprimare bazate pe linii celulare ale mamiferelor şi cele umane sunt foarte des utilizate, datorită avantajului de a produce proteine terapeutice ce respectă structura și activitatea moleculei native. Productivitatea bună este însă adesea asociată cu condiții de cultură pretenţioase.

Solubilitatea proteinelor

În timpul exprimării genelor recombinate, celula este supusă unui stres ridicat. În majoritatea cazurilor, proteina recombinată este purificată din mediul de cultură atunci când este secretată sau din fracția celulară solubilă atunci când este acumulată intracelular. Prin urmare, solubilitatea proteinei recombinate este parametrul cheie evaluat la stabilirea proceselor de producție și purificare. Adesea, proteinele recombinate exprimate sunt acumulate în agregate care formează nanoparticule intracelulare. Aceste agregate sunt denumite corpi de incluziune (*inclusion bodies*, IB) în *E. coli*, nanoparticule asemănătoare IB în alte gazde procariote și agresomi în gazdele eucariote. Raportul dintre cantitatea de proteină recombinată obținută în fracția celulară solubilă (versiunea solubilă a proteinei) și cantitatea de proteine acumulate în IB (versiunea insolubilă a proteinei), reprezintă solubilitatea proteinelor. Cele mai frecvente strategii pentru îmbunătățirea solubilității proteinelor predispuse la agregare includ reducerea ratei de creștere a celulei prin reducerea temperaturii de incubare, adaptarea compoziției mediului sau utilizarea promotorilor slabi. Proteina recombinată poate fi recuperată din fracția celulară insolubilă prin procese de denaturare / repliere *in vitro*. Obiectivul vizat în mod clasic este de a maximiza solubilitatea proteinelor în timpul procesului de producție.

În ultimele decenii, punctul de vedere al agregatelor de proteine naturale ca material inert s-a schimbat complet. IB sunt concepute ca depozite capabile să elibereze lent proteine recombinate active pentru a înlocui activitățile biologice specifice în liniile celulare defecte, pentru a recupera viabilitatea celulară în condiții de stres în cultura celulară sau chiar pentru a viza tipuri specifice de celule tumorale. În plus, IB au fost propuşi ca un biomaterial nou pentru utilizare în ingineria țesuturilor. Aplicaţiile inovatoare ale IB în nanomedicină indică rezultate promiţătoare sub forma

implanturilor subcutanate. Au fost identificate mai multe peptide predispuse la agregare care, prin fuziune cu proteine recombinate, pot spori procesul de agregare în celula producătoare. Astfel de tehnici sunt testate pentru îmbunătăţirea performanţelor biologice ale interferonilor (Carratala şi colab. 2020).

Perspective ale sistemelor de exprimare a proteinelor recombinate

Exploatarea sistemelor de exprimare se realizează prin linii celulare stabile, unde constructul de exprimare este integrat în genomul gazdei. Metodele convenționale de producere a proteinelor recombinante în sisteme bacteriene, celule de drojdii și celule umane, au dus la creşterea prețurilor și la probleme de biosecuritate pentru aceste produse. Tehnologia a avansat spre producția tranzitorie ce poate genera cantități mari de proteine pe termen scurt. Aceste sisteme de exprimare tranzitorie utilizează culturi în suspensie și pot produce molecule cu diverse modificări native de pliere și post-traducere. Au fost proiectaţi vectori virali bazaţi pe virusuri fitopatogene, care îşi păstrează capacitatea de a infecta întreaga plantă și, la câteva zile după infectare, aceasta devine un bioreactor pentru producerea de proteine recombinate. Transformarea cu ajutorul unor vectori hibrizi (virus fitopatogen şi ADN de transfer de la *Agrobacterium tumefaciens*) a condus la o bună productivitate pentru proteina recombinată. Beneficiile metodei includ: rata de producție rapidă și ridicată, costurile reduse de producție și siguranța biomoleculei (Naseri şi colab. 2019).

Diferite tehnici inovatoare precum biologia sistemelor, ingineria metabolică și tehnologia CRISPR-Cas pot fi aplicate pentru transformarea tulpinilor, pentru a îmbunătăți performanța bioprocesului și pentru a genera proteine biologic active și stabile. Strategiile de glicoinginerie pot facilita producerea ușoară a unei proteine terapeutice cu activitate biologică și siguranță îmbunătățite. O modalitate recent abordată de extindere a abilităţilor sistemelor biologice o reprezintă sinteza proteinelor in sisteme acelulare (Khambhati şi colab. 2019). Producătorii de biofarmaceutice se îndreaptă spre platforme mai simple, robuste și automate și spre dezvoltarea de produse rentabile, care pot sprijini dezvoltarea economică a unor biomolecule terapeutice ieftine şi accesibile.

9.2. Anticorpii monoclonali

Anticorpii monoclonali domină piaţa biofarmaceuticelor, 139 de produse primind aprobarea de comercializare în UE şi SUA din 1985. Piaţa anuală a acestor biomolecule este de peste 100 de miliarde de dolari, reprezentând mai bine de 70% din veniturile încasate din produse biofarmaceutice. Indicaţiile acestor biomolecule sunt multiple şi variate, iar cercetarea şi dezvoltarea lor în plină expansiune. Din cei 125 de anticorpi monoclonali aflaţi în prezent pe piaţă, 119 sunt produşi în linii celulare de mamifere şi doar 6 în sisteme microbiene, din care unul singur este o proteină completă exprimată în *Pichia pastoris* (eptinezumab-jjmr, Lundbeck Seattle BioPharmaceuticals).

Anticorpii sunt proteine produse de limfocitele B ale sistemului imunitar, ca răspuns la anumite antigene. Fiecare celulă B dintr-un organism sintetizează doar un singur tip de anticorp.

Într-un organism uman există mai multe populații de limfocite B şi astfel, mai multe tipuri de anticorpi sunt produşi ca răspuns la diferitele antigene la care organismul este expus. Pentru a fi util ca un instrument al biologiei moleculare, este nevoie de cantități substanțiale dintr-un singur tip de anticorp. Prin urmare, s-au dezvoltat metode care permit cultura unei singure populații de limfocite B. O astfel de linie pură este derivată dintr-o singură celulă B ancestrală, astfel încât această populație de limfocite B permite recoltarea unui singur tip de anticorp. Această populație de celule se numeşte monoclonală, iar anticorpii produși sunt numiţi **anticorpi monoclonali**. În contrast, anticorpii obținuți din sângele unui animal imunizat se numesc **anticorpi policlonali**.

9.2.1. Tehnologia producerii anticorpilor monoclonali prin metoda hibridomilor

Pionieratul producerii de anticorpi monoclonali a fost iniţiat de către Georges Kohler și Cesar Milstein în 1975. Metoda lor a fost testată şi perfecţionată, constând în:

1. Inducerea formării de celule B prin injectarea proteinei antigenice la şoarece;
2. Extragerea celulelor B din splina de şoarece;
3. Fuzionarea celulelor B obţinute cu o cultură de celule de mielom, rezultând hibridomi. Fuziunea se realizează prin folosirea de PEG, a unui virus sau prin electroporare;
4. Selctarea celulelor hibridom. Celulele de mielom sunt HGPRT- și celulele B sunt HGPRT+ (în funcţie de prezenţa hipoxantin guanin fosforibozil transferazei, o enzimă implicată în sinteza de nucleotide). Cultura este cultivată în mediu HAT (cu hipoxantină, aminopterină şi timidină), care poate susține doar celulele HGPRT+. Celulele de mielom care fuzionează cu o altă celulă de mielom sau nu fuzionează deloc vor muri în mediul HAT, deoarece acestea sunt HGPRT-. Celulele B care fuzionează cu o altă celulă B sau nu fuzionează deloc mor pentru că nu au capacitatea de a se divide la nesfârşit. Numai celulele hibridom formate între limfocitele B și celulele de mielom pot supraviețui, fiind HGPRT+ și canceroase;
5. Screeningul pentru a decide care hibridomi produc anticorpul dorit. Populaţia inițială de celule B utilizată în fuziune este heterogenă, nu toate celulele produc același anticorp. De aceea, populația hibridomilor nu produce un singur anticorp. O altă complicație este aceea că hibridomii sunt inițial tetraploizi, formaţi prin fuziunea a două celule diploide. Cu toate acestea, cromosomii suplimentari sunt pierduţi în diviziunile ulterioare într-un mod aleator;
6. Testarea pentru identificarea celulelor hibridom capabile să producă anticorpul ţintă se realizează prin cultivare, electroforeză şi Western blot. Etalonul este epitopul ţintă, care e marcat radioactiv sau imunofluorescent;
7. Odată detectat faptul că un anumit hibridom produce anticorpul potrivit, acesta este cultivat pe termen nelimitat și se recoltează anticorpii monoclonali.

Anticorpi monoclonali himerici, umanizaţi şi umani

Problema iniţială a fost aceea că anticorpii monoclonali obţinuţi erau cei de şoarece, şi nu umani. Acest inconvenient a fost surmontat ulterior, prin crearea anticorpilor himerici. Fragmentul de ADN care codifică porțiunea de legare a unui anticorp monoclonal de şoarece a fost fuzionat cu ADN codificând anticorpul uman în celulele vii. Exprimarea acestui ADN himeric în culturi de celule a condus la obţinerea unor anticorpi monoclonali parțial de șoarece, parțial umani, denumiţi

anticorpi himerici. Obţinerea anticorpilor monoclonali umanizaţi şi ulterior a celor umani a fost posibilă aplicându-se tehnica recombinării proteinelor, prin:
- Combinarea regiunii variabile a proteinei murine cu regiunea constantă a unui anticorp uman pentru a crea un anticorp himeric;
- Adăugarea numai a regiunilor de determinare a complementarității (hipervariabile) din regiunile variabile murine la un cadru IgG uman pentru a crea un anticorp umanizat;
- Utilizarea bacteriofagilor pentru screeningul regiunilor hipervariabile derivate de la om, pentru a crea un anticorp monoclonal uman complet.

9.2.2. Tehnologia producerii anticorpilor monoclonali prin metoda expunerii

În prezent, producerea de anticorpi monoclonali recombinați implică noi tehnologii, care presupun utilizarea de virusuri, drojdii sau celule animale. Aceste tehnici se bazează pe clonarea rapidă de segmente de gene ale unei imunoglobuline pentru crearea unor biblioteci de anticorpi cu secvențe de aminoacizi puţin diferite, astfel încât pot fi selectaţi anticorpii cu specificitățile dorite. Aceste tehnologii imită procesul *in vivo* pentru generarea de anticorpi și au loc într-o succesiune de patru etape cheie:
1. Generarea (sau clonarea) diversității genotipice;
2. Stabilirea legăturii dintre genotip și fenotip;
3. Aplicarea presiunii selective;
4. Amplificarea.

Procesul a fost inițial dezvoltat pentru colectarea genelor ce codifică anticorpi recombinați de la limfocitele B provenite de la șoareci sau om. Limfocitele pot fi naive (nu au întâlnit antigenul respectiv) sau activate. După recunoaşterea antigenului, limfocitele naive activate suferă o expansiune clonală, se diferenţiază în celule efectoare şi respectiv celule cu memorie (Zarnea şi Popescu 2011). Repertoriul genei imunoglobulinei este clonat într-un vector pentru a asigura legătura dintre genotipul și fenotipul fiecărui anticorp, iar clonele sunt selectate prin legarea la antigenul specific. Clonele izolate sunt exprimate în cantități suficiente pentru putea fi caracterizate și pentru a selecta cel mai bun candidat.

Principalul avantaj al tehnologiei de afișare *in vitro* îl reprezintă posibilitatea de a obține anticorpi împotriva oricărui tip de ținte și epitopi, deoarece construcția unui repertoriu naiv sau sintetic de anticorpi nu depinde de un răspuns imun *in vivo*. Chiar și anticorpii împotriva autoantigenelor, antigenelor toxice, instabile și non-imunogene pot fi izolați prin selecție din biblioteci combinatorii de anticorpi (Tsuruta şi colab. 2018).

9.2.3. Construcţia bibliotecilor de anticorpi şi clonarea repertoriului antigenic

Diversitatea combinatorială reprezintă mecanismul de producere a unui număr foarte mare de gene şi respectiv a unei imense diversităţi de molecule de anticorpi şi de receptori ai celulelor T, pornind de la un număr limitat de segmente de ADN prezente în genomul liniei germinale, prin recombinarea lor aleatorie. Amplificarea diversităţii anticorpilor pe această cale este favorizată de faptul că organizarea genelor pentru regiunile variabile (V) în linia germinală este în sine un factor

determinant de diversitate: regiunea V a catenei uşoare (VL) este codificată de două segmente (V – *variable* şi J – *joining*), iar cea a catenei grele de trei segmente (V, D – *diversity* şi J). Fiecare dintre aceste segmente este prezent într-un număr mai mare de secvenţe diferite. Datorită diversităţii de legare, rearanjarea lor permite ca de la un număr limitat de segmente să se poată obţine o varietate imensă de secvenţe. Regiunea VL se poate forma prin recombinarea aleatorie a oricăror segmente genetice V şi J, iar regiunea VH prin combinarea diferitelor segmente V, D şi J. Astfel se formează gene diferite, capabile să codifice imensa diversitate a anticorpilor şi a receptorilor celulelor T (Zarnea şi Popescu 2011).

În clonarea repertoriului antigenic (*repertoire cloning*), genele codificatoare ale lanțului greu (H) şi respectiv ale lanțului uşor (L) ale anticorpilor sunt amplificate separat. Urmează dispunerea aleatoare în perechi prin PCR sau clonare, pentru a forma constructe combinatorii. ARNm izolat dintr-un țesut care generează imunoglobuline este convertit în ADNc cu ajutorul revers-transcriptazei. Regiunile grele (VH şi CH1) ale Fd, componenta esenţială a lanțului greu al fragmentului Fab unde se leagă antigenul, sunt selectate și amplificate prin PCR. Similar se procedează şi pentru lanțul uşor (VL şi CL). Se obţin două biblioteci de clone, una pentru lanțul H şi una pentru lanțul L. Cele două populații de ADNc sunt combinate aleator pentru a forma constructe combinatorii prin inserare în colifagi împreună cu un promotor, și utilizate pentru a infecta *E. coli*. Plăcile sunt apoi testate pentru capacitatea de a lega un antigen.

Bibliotecile combinatorii de gene ale anticorpilor pot fi construite din diverse surse: sânge periferic uman, parenchim splenic, ganglioni limfatici și măduvă osoasă. Două tipuri de biblioteci de anticorpi sunt utilizate pentru selecția anticorpilor recombinați: biblioteci naive, derivate din organisme a căror sistem imunitar nu a fost activat pentru a recunoaște un antigen specific și biblioteci imune, derivate de la donatorii imunizaţi, infectaţi, bolnavi cronici sau care suferă de cancer. Biblioteca imună conține un repertoriu de anticorpi cu afinitate maturizată și astfel permite selectarea de anticorpi cu afinitate mai mare, în comparație cu biblioteca naivă.

Din cauza problemelor etice, a muncii laborioase, costisitoare și consumatoare de timp, dezvoltarea anticorpilor terapeutici umani nu permite construcţia de biblioteci combinatorii specifice fiecărei boli, care să ia în considerare fiecare antigen. O opțiune o constituie utilizarea unei biblioteci umane naive formată din repertoriul IgM de la donatori neimunizați intenţionat, prin procesul de recombinare V(D)J. Repertoriul de celule B poate conține celule cu memorie pentru imunizări sau infecții anterioare ale donatorilor. În principiu, o bibliotecă naivă poate fi aplicată pentru selecția anticorpilor monoclonali împotriva oricărui tip de antigen, deoarece surprinde o variabilitate ridicată a genelor imunoglobulinei și poate include gene de de la mai mulți donatori (Tsuruta şi colab. 2018).

9.2.4. Expunerea proteinelor recombinate pe suprafaţa bacteriofagilor

Tehnica expunerii proteinelor pe suprafaţa bacteriofagilor (*phage display*), concepută de George Smith în anul 1985, dezvoltată ulterior de Gregory Winter pentru aplicaţii biofarmaceutice, a fost decernată cu Premiul Nobel pentru Chimie în 2018. Oferă o modalitate modernă de a genera o bibliotecă de liganzi proteici (anticorpi) și, ulterior, de a examina acești liganzi pentru capacitatea lor de a lega o moleculă țintă selectată.

Metoda presupune următoarele etape:

1. Generarea unei biblioteci de gene, de obicei compuse din sute de mii / milioane de gene diferite, dintre care una codifică proteina (anticorpul) de interes;
2. Inserarea acestor gene (clonate în lot) fuzionate cu gene care codifică proteinele capsidei unui bacteriofag (pIII, pIV sau pVIII) într-o bibliotecă de bacteriofagi;
3. Incubarea bacteriofagilor cu *E. coli*, ceea ce facilitează replicarea virusurilor;
4. Exprimarea produsului genei de fuziune în timpul replicării și încorporarea ulterioară a acestuia în învelişul bacteriofagilor maturi, având ca rezultat afișarea proteinei de interes pe suprafața virusului;
5. Testarea întregii biblioteci de bacteriofagi pentru identificarea genei ce codifică proteina de interes. Acest lucru se realizează de obicei prin selecția de afinitate (*biopanning*). Biopanarea presupune trecerea bibliotecii de bacteriofagi peste molecule țintă imobilizate, de obicei într-o coloană imobilizată. Doar fagul care exprimă proteina specificației dorite va fi păstrat în coloana imobilizată.
6. Eluarea bacteriofagilor legaţi prin reducerea pH-ului tamponului de eluție sau prin includerea unui ligand competitiv în tampon;
7. Repetarea rundelor de biopanare, pentru a izola doar bacteriofagii care leagă ligandul imobilizat cu cea mai mare specificitate / afinitate;
8. Excizarea genei ce codifică proteina de interes din genomul bacteriofagului, cu ajutorul enzimelor de restricţie;
9. Încorporarea genei într-un sistem de exprimare adecvat (celule procariote, celule animale, organisme transgenice) şi producerea la scară largă a proteinei de interes.

Tehnologia de expunere a anticorpilor pe suprafaţa bacteriofagilor este utilizată în descoperirea anticorpilor monoclonali terapeutici datorită multor avantaje:

- A fost prima tehnologie de acest tip dezvoltată, astfel încât metodologia este bine stabilită;
- Folosește sistemul de exprimare în *E. coli*, care este ieftin, simplu, rapid, robust, productiv și scalabil;
- Permite construcţia unor biblioteci mari pentru selecția anticorpilor umani împotriva majorității antigenilor și a epitopilor doriți;
- Procesul de selecție este versatil, cu capacitatea de a determina epitopul anticorpului;
- Poate fi utilizat pentru maturarea de afinitate a anticorpilor;
- Umanizarea anticorpilor prin tehnica de selecție ghidată permite obținerea anticorpilor umani.

Tehnologia are şi unele dezavantaje:

- Selectarea unui anticorp cu afinitate scăzută din biblioteci naive și sintetice implică maturarea afinității *in vitro* pentru aplicare terapeutică;
- Exprimarea scăzută a anticorpilor în *E. coli* pentru unele secvențe de anticorpi izolați.

9.2.5. Expunerea proteinelor recombinate pe suprafaţa celulelor de drojdie

Este o tehnică de inginerie a proteinelor, care utilizează exprimarea proteinelor recombinate încorporate în peretele celular al drojdiilor *(yeast display)*, pentru izolarea și ingineria anticorpilor. Ca urmare a fuziunii cu proteina Aga2p (utilizată în mod natural de drojdie pentru a media

contactele intercelulare în timpul conjugării), proteina de interes este afișată pe suprafața celulelor de drojdie. Exprimarea acesteia prin Aga2p la suprafața celulei, minimizează interacțiunile potențiale cu alte molecule din peretele celular al drojdiei. Biblioteca de proteine expuse pe suprafaţa celulelor de drojdie este ulterior supusă separării magnetice și a citometriei de flux pentru a izola liganzii cu afinitate ridicată la aproape orice receptor, prin evoluție direcționată.

Avantajele expunerii proteinelor recombinate pe celulele drojdiei includ exprimarea și procesarea de tip eucariot, mecanismele de control al calității căii secretoare eucariote, efectele avidității (afinitate funcţională multiplă) și screeningul cantitativ al bibliotecii prin sortarea celulelor marcate fluorescent. Drojdia este un organism eucariot care **permite modificări complexe post-translaționale ale proteinelor** (glicozilare, pliere). Dezavantajul îl reprezintă dimensiunile mai mici ale bibliotecii mutante comparativ cu metoda expunerii pe suprafaţa bacteriofagilor.

Tehnicile de expunere a proteinelor recombinate pe suprafaţa bacteriofagilor şi a drojdiilor au condus la aplicaţii biofarmaceutice multiple, fiind dezvoltate o serie de anticorpi monoclonali pentru tratarea şi profilaxia bolilor infecţioase de origine virală (gripă, infecţii cu virusurile Ebola, Dengue, *Herpes simplex*, HIV-1, MERS-CoV, RSV) sau bacteriană (*Clostridium botulinum, C. difficile, C. tetani, Bacillus anthracis, Staphylococcus aureus*) (Sheehan şi Marasco 2015).

9.2.6. Expunerea proteinelor recombinate prin ARNm şi ribosomi

Această metodă de producere a anticorpilor monoclonali umani constituie o platformă revoluționară de expunere *in vitro* şi permite selectarea unor liganzi specifici cu potențial mare de dezvoltare a aplicaţiilor de diagnostic și terapie. Biblioteca de ADN care codifică pentru o anumită bibliotecă de proteine ligand este fuzionată genetic la o secvență distanțieră lipsită de un codon stop. În urma traducerii, această secvență distanțieră rămâne atașată la ARNt și ocupă tunelul ribosomal, permiţând proteinei de interes să iasă din ribosom și să se plieze. În etape repetate de biopanare, complexele ribosomale se leagă de ținta imobilizată la suprafață. Complexele nelegate sunt îndepărtate prin spălare, iar ARNm al complexelor care prezintă o polipeptidă de legare este recuperat şi amplificat. Astfel, informația genetică a polipeptidelor legate este disponibilă pentru analiză. În tehnica expunerii pe ribosomi, legătura dintre genotip (ADN, ARN) şi fenotip (proteină) se realizează în timpul traducerii *in vitro* prin stabilizarea complexului constând din ribosom, ARNm și polipeptida generată şi pliată corect (Zahnd şi colab. 2007).

Prin evitarea utilizării celulelor, tehnologia are câteva avantaje:

- Diversitatea bibliotecii nu este limitată de eficiența transformării celulelor bacteriene, ci doar de numărul de ribosomi și diferite molecule de ARNm prezente în eprubetă;
- Mutațiile aleatorii pot fi introduse cu ușurință după fiecare rundă de selecție (erori în PCR), deoarece bibliotecile nu trebuie transformate după etapă de diversificare.

Caracteristicile tehnologiei de afișare ribosomală permit construirea de biblioteci mult mai mari, precum şi **evoluția direcționată a proteinelor**. De asemenea, prezintă complexe monovalente în timpul selecției și astfel pot fi selectați liganzi specifici fără interferența parametrilor de aviditate.

9.2.7. Expunerea proteinelor recombinate prin ADN

Tehnologia de expunere ADN constituie o platformă completă care folosește tot un sistem fără celule, inițial dezvoltat pentru selectarea peptidelor legate de ADN-ul lor codificator prezent într-o bibliotecă. Reacțiile de transcriere și traducere se desfăşoară *in vitro* într-un compartiment de emulsie (STABLE - *Streptavidin-biotin linkage in emulsions*). O bibliotecă aleatorie de decapeptide cuprinzând proteine de fuziune formate din peptide și streptavidină legată cu histamină este sintetizată și ligată la ADN-ul biotinilat printr-o legătură stabilă. Biblioteca este supusă selecției de afinitate. ADN-ul izolat este inserat într-un vector, amplificat și secvențiat. Avantajul acestei metode comparativ cu expunerea prin ARNm şi ribosomi este că nu se impune asigurarea condiţiilor de lucru în medii libere de RN-aze pentru etapa de selecție, nefiind necesară etapa de transcriere inversă. Nu este necesară nici îndepărtarea codonului stop dintre acidul nucleic și peptidă. Tehnologia de expunere prin ADN este mai simplă decât alte metode de afișare completă *in vitro*. Totuşi, un dezavantaj îl reprezintă noutatea sa, lipsa unei platforme robuste și a cunoștințelor în comparație cu metodele mai vechi (Tsuruta şi colab. 2018).

9.2.8. Utilizările anticorpilor monoclonali

Anticorpii monoclonali au o varietate de utilizări în cercetare şi medicină, dar şi multiple aplicaţii comerciale. În domeniul biotehnologiei, tehnologia anticorpilor monoclonali a devenit omniprezentă:

- Diagnostic pentru a detecta urme de droguri, toxine sau hormoni cu ajutorul testelor ELISA sau testelor imunocromatografice rapide (ex. testul de sarcină, de ovulaţie etc);
- Identificarea un or agenţi patogeni (ex. SARS-CoV-2, HIV etc) ori a tulpinilor patogene ale unei specii (ex. *Legionella pneumophila, Neisseria gonorrhoeae* etc);
- Radioimunodetecţia şi radioimunoterapia cancerului;
- Identificarea şi urmărirea unor celule sau molecule specifice în organism (în special de interes pentru stări patologice);
- Tratamentul cancerului;
- Tratamentul bolilor autoimune;
- Tratamentul bolilor virale;
- Atenuarea respingerii în cazul transplantului de organe.

Terminaţia -mab provine de la termenul *monoclonal antibody*, iar originea se poate distinge: murini (-omab), himerici (-ximab), umanizaţi (-zumab) sau umani (-umab). Câteva exemple de anticorpii monoclonali, dintre cei mai utilizaţi şi recent aprobaţi pentru terapie:

• Pentru terapia bolilor inflamatorii (artrită reumatoidă, astm, boala Crohn, colită ulcerativă, migrenă, spondilită anchilozantă, sau împotriva respingerii transplantului): **adalimumab, benralizumab, erenumab, omalizumab** etc;

• Pentru terapia bolilor autoimune: **infliximab, natalizumab, ocrelizumab, risankizumab, rituximab** etc;

• Pentru terapia diferitelor tipuri de cancer (leucemii, limfoame, carcinoame, terapie anti-angiogenică): **avelumab, bevacizumab, cetuximab, enfortumab vedotin, gemtuzumab,**

inotuzumab, isatuximab, naxitamab, nivolumab, margetuximab, polatuzumab vedotin, ranibizumab, rituximab, sacituzumab, tafasitamab, trastuzumab etc;

- Pentru terapii antivirale: **atoltivimab, odesivimab** şi **maftivimab** (infecţie cu virusul Ebola), **casirivimab** şi **imdevimab** (maladia COVID-19), **palivizumab** (infecţii cu RSV), **ibalizumab** (infecţii cu HIV tip 1), **rabimab** (infecţii cu virusul rabiei) etc;
- Pentru efect anticancerigen şi antiviral: **bavituximab** (infecţii cu virusul hepatitei C);
- Pentru a preveni coagularea sau pentru a neutraliza anticoagulanţi: **abciximab, idarucizumab**;
- Pentru alte afecţiuni: **brolucizumab** (degenerescenţa maculară, **burosumab** (hipofosfatemia X-linkată), **caplacizumab** (purpura trombocitopenică), **crizanlizumab** (anemia falciformă), **emicizumab** (hemofilia A), **eptinezumab** (migrena), **inebilizumab** (neuromielita optică), **romosozumab** (osteoporoza), **teprotumumab** (oftalmopatia de origine tiroidiană) etc.

9.3. Peptidele sistemului imunitar

Citokinele reprezintă un grup foarte important de biofarmaceutice. Sunt molecule de natură proteică sau glicoproteică care au rolul de mediatori în comunicarea intercelulară, inclusiv între celulele sistemului imunitar. Intervin în mecanismele inflamației și în apărarea contra agenților infecțioși, în apărarea antitumorală, în șocul septic etc. Printre cele mai importante citokine se numără interferonii, interleukinele, factorii de necroză tumorală, factorii de creștere, factorii de stimulare a hematopoiezei şi factorii supresori (virali, de transcriere etc).

Deși au structuri proteice diferite și acționează diferit în procesul imun, citokinele au anumite proprietăți comune precum:

A. Pleiotropia - fiecare citokină are activități biologice multiple;
B. Redundanța - citokine din grupuri diferite pot avea efecte biologice și biochimice asemănătoare;
C. Sunt active în concentrații foarte mici, secreția lor este de scurtă durată;
D. Reacțiile modulate de citokine sunt produse în cascadă;
E. Au receptori specifici de mare afinitate;
F. Acțiunea lor se manifestă autocrin, paracrin sau endocrin.

9.3.1. Interferoni

Interferonii (IFN) sunt prima familie de citokine descoperite, descrise în anul 1957 de către cercetătorii Alick Isaacs şi Jean Lindenmann. Studiind interferenţa virală, aceştia au observat că celulele animale expuse atacului unui virus de colonizare au devenit imediat rezistente la atacul altor virusuri. Rezistența a fost indusă de un factor antiviral, o substanță secretată de celulele infectate, care a fost denumită interferon. Ulterior, s-a arătat că cele mai multe specii produc la nivel celular o serie întreagă de interferoni.

Interferonii sunt proteine secretate de celulele eucariote ca răspuns la atacul virusurilor sau al bacteriilor intracelulare, tumori și alți inductori biologici. S-a dovedit că produc beneficii clinice în diverse stări de boală, cum ar fi hepatita A, B, C, D, E, infecţia cu pegivirus uman (anterior

denumit virus GB C, HPgV, virusul hepatitei G), în diverse tipuri de cancer, boli autoimune precum scleroza multiplă etc.

Din punct de vedere strucural, interferonii fac parte din familia de citokine elicoidale şi constau dintr-un lanț de 145-166 aminoacizi. Se cunosc peste 20 de familii diferite de inteferoni (**Tabel 11**).

Tabel 11. Interferonii umani şi liniile de celule producătoare.

Familia de interferoni	Număr de IFN în familie	Celule producătoare
IFN-α	>15	Limfocite Monocite Macrofage
IFN-β	1	Fibroblaste Celule epiteliale
IFN-γ	1	Limfocite T Limfocite T-NK
IFN-λ	4	Celulele epiteliului intestinal

În funcție de tipul de receptor, interferonii umani au fost clasificaţi în trei tipuri majore:

1. Interferonii de tip I: se leagă de un complex specific al receptorilor de suprafață ai celulei, cunoscut ca receptorul IFN-α / β (IFNAR), format din lanțuri IFNAR1 și IFNAR2. Interferonii de tip I prezenţi la om sunt IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ şi IFN-ω.

2. Interferonii de tip II: se leagă de receptorul IFNGR care constă din lanțuri IFNGR1 și IFNGR2. La om este prezent IFN-γ.

3. Interferonii de tip III: transmit semnalul printr-un complex receptor format din IFNLR1 (CRF2-12) şi IL10R2 (CRF2-4). La om este prezent IFN-λ. IL10R2 este receptorul interleukinei 10, iar CRF reprezintă receptorul de eliberare a hormonului (factorilor) corticotropinei, un mediator puternic al funcţiilor endocrine, de comportament și răspuns imun la stres (Borden şi colab. 2007).

Receptorii citokinelor pot fi împărțiţi în două grupe: cei ale căror domenii intracelulare exprimă activitatea intrinsecă a proteinei tirozin kinază (PTK) și cei ale căror domenii intracelulare sunt lipsite de o astfel de activitate. Cei din urmă în general activează PTK intracelulară solubilă prin legarea de un ligand. Kinazele Janus (JAK) reprezintă o familie recent descoperită de PTK, care joacă un rol central în medierea semnalului de transducție a multor citokine, respectiv a interferonilor: *Janus-activated kinase–signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT).

Efectele biologice ale interferonilor. Efectul biologic al IFN este mediat prin legarea de receptorii de suprafață ai celulei. Legarea este urmată de inițierea semnalului şi se încheie cu modificarea nivelului de exprimare a mai multor gene sensibile la IFN. IFN sunt produşi de o varietate de tipuri de celule, prezentând o gamă largă de efecte biologice:

A. Inducerea rezistenței celulare la atac viral;
B. Reglarea funcţiei imune;
C. Reglarea creșterii și diferențierii mai multor tipuri de celule;
D. Susținerea fazelor timpurii ale sarcinii (Walsh, 2007).

Nu toate tipurile de interferoni induc exact aceeași gamă de răspunsuri, iar raportul activității antivirale şi antiproliferative diferă de la un interferon la altul. Întrucât toate clasele de interferoni aparţinând aceluiaşi tip se leagă la același receptor, bazele moleculare ale variației activității biologice nu sunt pe deplin înțelese (Ryff şi colab. 2008).

În general, interferonii de tip I (IFN-α, IFN-β) induc efecte similare, diferite de efectele induse de IFN-γ. Ei au activitate antivirală pronunțată, precum și efect anti-proliferativ asupra diferitelor tipuri de celule, inclusiv anumite tipuri de celule tumorale. Efectele anti-tumorale se datorează şi rolului IFN tip I de a stimula activitatea celulelor NK și limfocitelor T citotoxice. Aceste celule pot recunoaște și distruge celulele canceroase.

IFN-γ prezintă o activitate antivirală și antiproliferativă slabă. Când se administrează concomitent cu interferoni tip I (IFN-α / β), potențează activitatea acestora. IFN-γ este direct implicat în reglarea multor aspecte ale răspunsului imun și inflamator, promovând activarea, creșterea și diferențierea unei varietăți largi de tipuri de celule implicate. IFN-γ reprezintă principalul factor de activare a macrofagelor, sporind astfel efectele mediate de către acestea: distrugerea microorganismelor, distrugerea agenților patogeni intracelulari, citotoxicitatea celulei tumorale, exprimarea MHC, ceea ce duce la activarea limfocitelor.

Deși au fost mai nou descoperiţi, informațiile recente demonstrează importanța IFN tip III (IFN-λ) în anumite tipuri de infecții virale şi se află în cercetare pentru terapia oncologică.

Utilizarea terapeutică a interferonilor:

- IFN-α: hepatită B şi C, infecţii cu HPV, HIV-SIDA;
- IFN-β: scleroză multiplă;
- IFN-γ: granulomatoză cronică, infecţii cauzate de *Leishmannia*, *Mycobacterium leprae,* HIV-SIDA, citomegalovirus, virusul varicelei zosteriene şi diverse tipuri de cancere.

Obţinerea biotehnologică a interferonilor

Până în anii 1970, interferonul a fost obţinut în cantități mici, direct din leucocite umane recoltate de la donatorii de sânge. Acest preparat era un amestec de IFN diferiţi, cu o puritate de 1%. Cu toate acestea, studiile clinice efectuate cu acele cantități mici de preparate impure au generat rezultate încurajatoare. Producția de interferoni în cantități semnificative a devenit posibilă prin intermediul culturilor de celule animale. Unele linii de celule canceroase s-au dovedit a secreta interferoni în cantităţi mai mari decât celulele normale, și astfel a început producţia la scară largă, utilizându-se celule transformate. Mai mult decât atât, tehnologia hibridomilor a facilitat dezvoltarea testelor imunoenzimatice pentru interferon. Metoda este similară celei pentru obţinerea anticorpilor monoclonali:

1. Obţinerea hibridomilor:
   a) Prepararea substanţei imunogene (ex. IFN-α);
   b) Imunizarea şoarecilor;
   c) Testarea prezenţei micoplasmelor în linia celulară mielocitară;
   d) Fuziunea celulelor producătoare de anticorpi (din splina şoarecilor) cu linia celulară mielocitară;
   e) Examinarea microscopică pentru evidenţierea celulelor hibridom;

f) Testarea pentru anticorpi anti-IFN a supernatantului din placa de incubare ce conține clone vii.

2. Selectarea hibridomilor producători de anti-IFN prin metoda aderării semisolide:
   a) Aderarea anticorpilor de şoarece la pereţii plăcii de incubare;
   b) Legarea anticorpilor anti-IFN la anticorpii de şoarece din placa de incubare;
   c) Reacţia dintre interferonul uman şi complexul anti-IFN de şoarece legat la placă;
   d) Testarea interferonului rezidual.
3. Propagarea liniei hibridom producătoare de anti-IFN;
4. Izolarea anticorpilor anti-IFN;
5. Caracterizarea anticorpilor anti-IFN capabili să recunoască mai multe subtipuri de IFN uman;
6. Utilizarea anticorpilor monoclonali LO-22 pentru detecţia IFN-α uman şi pentru screeningul contaminării virale.

Linia de celule Namalwa (limfoblaste umane) a devenit sursa industrială majoră de interferon. Celulele au fost propagate în fermentatoare mari, de până la 8.000 de litri. Prin adăugarea unui virus (de obicei virusul Sendai) s-a realizat producerea de cantități importante de interferon leucocitar. Analiza ulterioară a arătat acesta era format din cel puțin opt subtipuri distincte IFN-α.

Tehnologia ADN recombinat a facilitat producția de interferoni în cantități suficiente pentru a satisface nevoile medicale. Începând din anii 1980 s-a realizat clonarea și exprimarea genelor codificatoare ale IFN într-o varietate de sisteme de exprimare: *E. coli*, fungi, drojdii și unele linii celulare de mamifere, precum CHO și linii de celule Vero. Exprimarea genelor specifice a condus în mod evident la produşi care conţin un singur subtip de interferon. Cei mai mulţi interferoni aflaţi în prezent în uz medical (**Tabel 12**) sunt produşi umani recombinaţi şi produşi în tulpini de *E. coli*. Incapacitatea bacteriei *E. coli* de a efectua modificări post-translaționale este lipsită de relevanță în cele mai multe cazuri, deoarece majoritatea moleculelor de IFN-α, precum și IFN-β umane nu sunt glicozilate în mod normal. Deşi molecula IFN-γ uman este glicozilată, forma neglicozilată derivată de la *E. coli* prezintă o acțiune biologică similară proteinei umane native.

Tabel 12. Medicamente pe bază de interferoni disponibile în UE şi SUA.

IFN umani recombinaţi	Denumire	Indicaţii terapeutice
IFNα-2a	Peginterferon α-2a (Pegasys)	Hepatită C
IFNα-2b	Peginterferon α-2b (PEG-Intron, ViraferonPeg, IntronA, Alfatronol) Peginterferon/ribavirină (PEG-Intron/Rebetol, Rebetron)	Hepatită B şi C, HPV Cancer, papiloame genitale Hepatita C cronică
IFNβ-1a	Peginterferon β-1a (Plegridy, Rebif, Avonex)	Scleroză multiplă
IFNβ-1b	Peginterferon β-1b (Extavia, Betaferon, Betaseron)	Scleroză multiplă
IFNγ-1b	Interferon γ-1b (Actimmune)	Granulomatoză cronică

Obţinerea cu ajutorul tulpinilor de *E. coli* modificate, în care a fost inserată gena responsabilă pentru producerea IFN, cu ajutorul vectorului de exprimare citoplasmatică KMAC-43 a permis fermentaţia în bioreactoare cu volume de până la 42.000 de litri. În final, după recuperarea produsului din celule, acesta se purifică prin metode cromatografice, este cristalizat şi liofilizat (Walsh 2007). Un număr mare de produse biofarmaceutice pe bază de interferon recombinat produs

în celule de *E. coli* sau în linii celulare CHO au obţinut aprobarea de comercializare. Acestea includ IFN conjugat cu PEG (PegIntron dezvoltat de Merck Sharp Dohme; Plegridy, Biogen şi altele), sau interferonul sintetic cu o succesiune modificată a aminoacizilor (Betaferon şi Betaseron, Bayer Pharma).

9.3.2. Interleukine

Interleukinele (IL) reprezintă o altă familie mare de citokine, şi cel puțin 36 de IL diferite au fost caracterizate până la această dată (IL-1 până la IL-38). Majoritatea acestor factori polipeptidici sunt molecule glicozilate (o excepție notabilă fiind IL-1) și au o masă moleculară cuprinsă de la 15 la 40 kDa (Walsh 2007). Cele mai multe dintre interleukine sunt produse de un număr de diferite tipuri de celule (**Tabel 13)**. Cel puțin 17 de tipuri diferite de celule sunt capabile de a produce IL-1, iar IL-8 este produsă de cel puțin 10 tipuri distincte de celule. Pe de altă parte, IL-2, IL-9 și IL-13 sunt produse numai de limfocitele T.

Tabel 13. Celule producătoare de interleukine.

Tipul celulei	**Interleukine produse**
Limfocite T helper	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-31
Limfocite T citotoxice	IL-10, IL-16
Limfocite B	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12
Limfocite	IL-8, IL-12, IL-14, IL-16, IL-24, IL-25, IL-26, IL-35
Celule NK	IL-13, IL-21
Macrofage	IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-25, IL-27
Mastocite	IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-25
Monocite	IL-1, IL-10,IL-20, IL-24, IL-26
Eozinofile	IL-3, IL-5, IL-16, IL-25
Celulele endoteliului vascular	IL-1, IL-3, IL-6, IL-8
Celulele stromale	IL-7, IL-11
Celule dendritice	IL-12, IL-23, IL-27
Fibroblaste	IL-1, IL-6, IL-8, IL-11
Keratinocite	IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-20, IL-24
Celule epiteliale	IL-25, IL-33

Răspunsurile biologice induse de interleukine sunt variate și extrem de complexe. Aceste citokine pot regla o varietate de condiții fiziologice și patologice, inclusiv:

- creşterea celulelor sănătoase şi canceroase;
- toate aspectele legate de răspunsul imun;
- reglarea inflamației (Walsh 2007; Ryff şi colab. 2008).

Mai multe interleukine se bucură de un interes clinic semnificativ, în special cele capabile să moduleze creșterea celulelor transformate, precum și cele care prezintă proprietăți imunostimulatoare. Ca și în cazul altor citokine, tehnologia ADN recombinat facilitează producerea acestor molecule în cantități suficiente pentru a răspunde nevoilor medicale reale şi potențiale. Până acum, puţine produse pe bază de interleukine au fost aprobate pentru uz medical general: IL-1 anakinra, IL-11 oprelvekin și IL-2 aldesleukina. Există biofarmaceutice în diverse stadii de cercetare clinică, pecum IL-10 Tenovil şi altele, care nu au încă un nume comercial.

Interleukine umane recombinate

Interleukina 1

Familia IL-1 cuprinde 11 citokine, cele mai cunoscute fiind cele două forme distincte IL-1α și IL-1β. Deși sinteza lor e codificată de gene diferite și prezintă o omologie a secvențelor de aminoacizi de doar 20%, ambele molecule se leagă la același receptor și induc activități biologice similare:

- Sunt citokine proinflamatorii, promovând sinteza diferitelor substanțe cum sunt eicosanoidele, proteazele și alte enzime implicate în generarea mediatorilor inflamatorii;
- Au rol în activarea limfocitelor B şi proliferarea limfocitelor T, împreună cu alte citokine;
- Alături de IL-6, induc sinteza proteinelor de fază acută în hepatocite;
- Acționează în calitate de co-stimulatori ai hematopoiezei;
- Induc sinteza proteinei C reactive (marker al unui proces inflamator);
- Cresc sinteza IL-2, IL-6, IL-8, IL-11 şi a altor citokine (G-CSF, TNF-α);
- Induc exprimarea moleculelor MHC II;
- Induc sinteza hormonilor glucocorticoizi;
- Au rol pirogen endogen;
- Au activitate autocrină.

Precursorul IL-1α este o proteină cu greutate moleculară de 31 kDa scindat de calpaină (cistein-protează asociată plasmalemei) şi alte proteaze în molecula matură de 18 kDa. Este sintetizată în asociere cu structurile citoscheletului, spre deosebire de riboproteine, pentru care translaţia are loc în ribosomii asociaţi reticulului endoplasmatic rugos. Atât precursorul IL-1α, cât și forma sa matură sunt biologic active (Walsh, 2007).

IL-1 este în prezent evaluată clinic în special în afecţiuni canceroase precum mielomul multiplu, dar şi în boli autoimune şi artrita reumatoidă, pentru efectul imunostimulator, antiproliferativ, hematopoietic şi de refacere a măduvei osoase după chimioterapie. Pentru a contracara activitatea proinflamatorie a IL-1, au fost dezvoltaţi antagonişti ai receptorului pentru IL-1, precum **anakinra** (Kineret, Swedish Orphan Biovitrum). Molecula recombinată, produsă cu ajutorul unei tulpini modificate de *E. coli* diferă de molecula umană nativă. Este tot neglicozilată, dar conține un rest suplimentar N-terminal de metionină, o consecință a sistemului de exprimare procariot. Anakinra a fost aprobată (2001) pentru afecţiuni autoinflamatorii precum poliartrită reumatoidă şi NEOIMD (*Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease*) şi se află în cercetare clinică pentru osteoartrită, dermatită atopică severă şi alergii cutanate, hidraadenită, urticarie, boli ale urechii interne, diabet, afecţiuni cardiovasculare, boli canceroase, sindromul oboselii cronice şi altele.

Interleukina 2

IL-2 este un tetrahelix de 16 kDa, inițial descrisă ca factor de creştere al celulelor T (TCGF). Sintetizată și secretată în principal de celulele T helper (CD4+), IL-2 poate stimula creșterea, diferențierea, activarea şi proliferarea limfocitelor T, B şi T-NK, fiind citokina principală implicată în declanșarea unui răspuns imun eficient și factorul esențial al reglării răspunsului imun. Stimulează sinteza IL-4, IL-5 şi IL-6.

Ca și în cazul celor mai multe citokine, utilizarea terapeutică şi evaluarea clinică a IL-2 a fost inițial imposibilă, datorită cantităților infime în care este produsă în mod normal. Unele linii celulare transformate, în special linia de celule leucemice Jurkat, produc IL-2 în cantități mai mari, și IL-2 utilizată pentru studiile inițiale a fost astfel obținută. Producerea IL-2 la scară largă a fost posibilă prin tehnologia ADN recombinat. Deşi gena pentru IL-2, respectiv ADNc a fost exprimată într-o mare varietate de sisteme gazdă, inițial a fost exprimată în *E. coli*. Absenţa glicozilării asupra produsului recombinat nu schimbă activitatea sa biologică.

Aldesleukina (Proleukin, Prometheus Laboratories) este o IL-2 recombinată, aprobată (1992) pentru tratamentul anumitor tipuri de cancer, precum carcinomul renal. Molecula exprimată în celule de *E. coli* diferă de IL-2 nativă umană prin aceea că este neglicozilată, îi lipsește un rest de alanină N-terminal, iar cisteina din poziţia 125 a fost înlocuită cu un rest de serină. După extracție și purificare cromatografică, produsul este formulat într-un tampon fosfat care conține manitol și dodecilsulfat de sodiu (SDS). Produsul prezintă activitate biologică tipică, inclusiv stimularea mitogenezei limfocitelor, citotoxicitatea, inducerea activităţii celulelor NK activate de limfokine (celule LAK) și inducerea producerii de IFN-γ.

Interleukina 2 şi tratamentul cancerului

Activitatea imunostimulatoare a IL-2 s-a dovedit benefică în tratamentul unor tipuri de cancer, în special a celor cu o componentă imunologică importantă. Experimentele au arătat că limfocitele incubate *in vitro* cu IL-2 ar putea ucide ulterior o serie de linii de celule canceroase, inclusiv celulele melanomului şi celulele de colon canceroase. Acest ultim tip de cancer nu răspunde bine la terapiile convenționale. Distrugerea celulelor canceroase este mediată de celulele LAK. Investigaţii suplimentare au arătat că tratamentul cu IL-2 are rezultate semnificative şi în cazul altor tipuri de cancer, cum este cel ovarian, al vezicii urinare, limfom non-Hodgkin și leucemie mieloidă acută.

Denileukina diftitox (Ontak, Eisai) este o proteină de fuziune recombinată a ligandului IL-2 uman și a toxinei difterice. Acest medicament se leagă de receptorii IL-2 și introduce toxina difterică în celule care exprimă acei receptori, ucigându-le. În unele leucemii și limfoame, celulele maligne exprimă receptorul IL-2, astfel încât denileukina diftitox le poate distruge. În 1999, Ontak a fost aprobat de către FDA pentru tratamentul limfomului cutanat cu celule T.

Tucotuzumab celmoleukin (Merck) este o proteină de fuziune recombinată cu activitate antineoplazică, formată dintr-un anticorp monoclonal uman îndreptat împotriva moleculei de adeziune a celulelor epiteliale, legat de IL-2. Rezultatele studiilor clinice au fost nesatisfăcătoare.

Interleukina 2 și bolile infecțioase

Deşi antibioticele au făcut posibil controlul medical al diferiților agenți infecțioși (în principal bacterieni), există totuşi numeroşi agenţi patogeni pentru care nu există un tratament eficient. Majoritatea acestor infecţii sunt non-bacteriene (de exemplu, virale, fungice și parazitare, inclusiv cauzate de protozoare). În plus, utilizarea neraţională a antibioticelor a grăbit dezvoltarea unor super-bacterii rezistente la antibiotice, care au devenit o problemă medicală gravă. Infecţiile microbiene cel mai dificil de tratat sunt de multe ori cele în care agentul patogen se reproduce în celule gazdă (de exemplu unele virusuri, bacterii intracelulare și paraziți). Unii dintre aceşti agenţi sunt capabili chiar să supraviețuiască și să reproducă în macrofage, ulterior înglobării lor prin

fagocitoză. Astfel sunt bacteriile *Listeria monocytogenes, Legionella pneumophila* sau micobacteriile (*Mycobacterium tuberculosis* și *M. leprae*)

Răspunsul imunitar împotriva agenților patogeni intracelulari este în mare măsură un răspuns al celulelor T. Capacitatea IL-2 de a stimula celulele T poate face utilă prescrierea acesteia în tratamentul unei game largi de astfel de stări patologice. Evaluarea eficacităţii în tratarea unei serii de boli infecțioase este în derulare.

IL-2 a fost inclusă în studiile clinice pentru tratamentul infecțiilor virale cronice și ca un adjuvant pentru vaccinuri. Includerea genelor pentru IL-2 în cocktailurile de vaccin a dus la îmbunătățirea imunogenității vaccinale antivirale împotriva HIV, a gripei şi a SARS-CoV. Utilizarea dozelor mari de IL-2 administrată în terapia infecţiilor cu HIV, similară utilizării sale în tratamentul cancerului, s-a dovedit a fi ineficientă în prevenirea progresului bolii SIDA. Recent, administrarea IL-2 în doză scăzută a demonstrat succesul timpuriu în modularea sistemului imunitar în boli precum diabetul de tip 1 și vasculita. Există, de asemenea, studii promițătoare care doresc să utilizeze o doză scăzută de IL-2 în boala cardiacă ischemică.

Interleukina 10

Este un homodimer alcătuit din două subunităţi cu lungimea de 178 aminoacizi fiecare. IL-10 este o citokină cunoscută și sub numele factor inhibitor al sintezei citokinelor umane (CSIF), fiind o proteină cu rol antiinflamator şi având multiple efecte imunomodulatoare. În prezent se derulează studii clinice având ca scop evaluarea IL-10 umane recombinate, inclusiv forma conjugată cu PEG în afecţiuni tumorale, pancreatită acută, pentru prevenirea formării cicatricilor. Un nivel scăzut al IL-10 a fost observat la pacienţii cu scleroză multiplă, comparativ cu indivizii sănătoşi.

Produsul **ilodecakin** (Tenovil, Merck**)** este IL-10 recombinată, care a fost evaluată clinic pentru afecţiuni precum boala Crohn şi pancreatita, însă rezultatele au fost dezamăgitoare. IL-10 nu a condus la o rată de remisie semnificativă sau la îmbunătăţirea stării clinice a pacienţilor trataţi comparativ cu lotul placebo (Marlow şi colab. 2013). În prezent IL-10 este investigată într-o nouă abordare, aceea a dozelor mici.

Interleukina 11

Cunoscută şi sub numele de factorul de inhibare a adipogenezei, IL-11 umană nativă este o proteină de 178 de aminoacizi. Produsă în majoritate de celulele stromale medulare și fibroblastele activate de IL-1, funcționează ca un factor de creștere hematopoietică. Stimulează trombopoieza (producerea de trombocite din celulele mari ale măduvei osoase numite megacariocite), dar și creșterea şi diferențierea celulelor măduvei osoase, derivate din celule stem angajate spre diferențiere în macrofage. Supraexprimarea genei IL-11 este asociată cu diverse forme de cancer.

Oprelvekin (Neumega, Pfizer) este o citokină aprobată pentru prevenirea trombocitopeniei, ca precursor al IL-11. Produsul este obținut prin inginerie genetică, în celule de *E. coli* transformate și este prezentată ca un produs purificat liofilizat. Molecula obţinută este o proteină neglicozilată, o polipeptidă formată din 177 aminoacizi, însă această alterare nu generează diferențe în bioactivitatea *in vitro* sau *in vivo*.

9.3.3. Factori de necroză tumorală

Factorii de necroză tumorală (TNF) sunt citokine esenţiale, proteine de fază acută implicate în inflamaţia sistemică. Se cunosc două astfel de molecule, TNF-α (casectina) şi TNF-β (limfotoxina) care, deşi au o omologie limitată a secvenţelor, se leagă la acelaşi receptor şi induc activităţi biologice similare. TNF-α, cunoscut şi ca factor citotoxic al macrofagelor sau necrozină, este sintetizat de macrofage, dar şi de alte celule: limfocite T-NK, eozinofile, limfocite B, T sau polimorfonucleate, celule Kupffer, celule Langerhans, fibroblaste, astrocite, microglii etc. TNF-α este sintetizat sub forma unui precursor polipeptidic de 233 de aminoacizi, scindat de o metaloprotează în trei reziduuri de câte 76, 77 şi respectiv 157 de aminoacizi. Propeptida are activitate biologică, însă monomerii sunt inactivi. Ulterior, cei trei monomeri sunt asociaţi necovalent într-un homotrimer. Sinteza TNF este stimulată de lipopolizaharide şi enterotoxine bacteriene, de micobacterii, fungi, virusuri, paraziţi, complexe antigen-anticorp, alte citokine (IL-1) şi TNF-α (autocrin). Rolul biologic al TNF este corelat acestor stimuli:

- Activează mecanismele imunitare;
- Induc şi reglează răspunsul inflamator;
- Au activitate citotoxică împotriva celulelor tumorale;
- Mediază stări patologice, precum şocul toxic, casexia şi anorexia (Walsh 2007).

Tasonermin (Berimun, Boehringer Ingelheim) este disponibil încă din anul 1999 pentru uz medical general, un factor uman recombinat obţinut în celule de *E. coli*. Este indicat în sarcomul ţesuturilor moi, ca terapie adjuvantă la intervenţia chirurgicală de îndepărtare a tumorilor, pentru prevenirea sau amânarea amputărilor. Interesul inițial în utilizarea TNF ca agent anti-cancer a scăzut, în mare parte din cauza rezultatelor care au indicat că multe tumori nu sunt susceptibile la distrugerea mediată de TNF, iar necrozarea celulelor tumorale nu constituie activitatea biologică majoră a TNF. De asemenea, administrarea sistemică a dozelor terapeutice ale acestei citokine sunt însoţite de reacții adverse severe.

Cu toate acestea, interesul clinic pentru TNF se concentrează acum asupra neutralizării efectelor sale biologice, în situații în care supraexprimarea TNF induce efecte clinice negative. TNF este implicat în medierea multora dintre efectele adverse asociate unor boli: casexie şi stimularea creşterii tumorilor în cancer; permeabilitate vasculară, necroza țesuturilor, hipotensiune, activarea coagulării sângelui în şocul septic; inflamarea țesuturilor, distrugerea articulațiilor în artrita reumatoidă; inflamaţii în scleroza multiplă; moartea celulelor insulelor Langherhans pancreatice inducând rezistența la insulină în diabet. Administrarea anticorpilor monoclonali anti-TNF sau a formelor solubile ale receptorului TNF ar trebui să contribuie la reducerea severității multor simptome asociate acestor boli.

Etanercept (Enbrel, Amgen şi Pfizer) este un produs care se bazează pe această strategie, aprobat din 1998 pentru uz medical. Este o proteină recombinată alcătuită din domeniul extracelular al receptorului TNF fuzionat direct în regiunea Fc (constantă) a IgG umane, exprimată în linii celulare CHO. Funcţionează ca inhibitor competitiv al TNF, recomandat în tratamentul artritei reumatoide. Întrucât brevetul medicamentului original a expirat, din anul 2016 au fost lansate pe piaţă cateva produse biosimilare conţinând etanercept. Benepali (Samsung Bioepis), Limfior (Pfizer) şi Erelzi (Sandoz) sunt noi proteine de fuziune.

9.3.4. Factori de creştere

Diferențierea, creșterea și diviziunea celulelor eucariote este influenţată de diverşi modulatori, dintre care factorii de creștere sunt printre cei mai importanți. A fost identificată o gamă largă de factori de creștere polipeptidici, ce ţintesc anumite celule:

- Interleukinele – celule implicate în imunitate şi inflamaţii;
- IFN-γ – limfocite, celule ce mediază imunitatea şi inflamaţia;
- Factorii de stimulare a coloniilor (CSF) – celule hematopoietice;
- Eritropoietina (EPO) – celule precursoare ale eritrocitelor;
- Trombopoietina (TPO) – megacariocite;
- Factorii neutrofici – neuroni;
- Insulina – diverse celule;
- Factorii de creştere asemănători insulinei (IGF) – varietate de celule;
- Factorii de creştere epidermică (EGF), a celulelor vasculo-endoteliale (VEGF), fibroblastelor (FGF);
- Factorii de creştere derivaţi din trombocite (PDGF) – fibroblaste, celule gliale, fibre musculare netede;

Există și factori care inhibă creșterea celulelor, cum sunt IFN și TNF, ce inhibă proliferarea diferitelor tipuri de celule. Unii factori de creștere precum IL, CSF etc pot fi clasificați ca citokine. Alții, cum este IGF nu sunt membri ai acestei familii. Capacitatea factorilor de creștere de a promova creșterea celulară accelerată, diferențierea și / sau diviziunea a atras în mod previzibil atenția industriei farmaceutice. Multe produse biofarmaceutice au obținut acum aprobarea pentru utilizarea medicală generală, atât în direcţia factorilor de creştere hematopoietici, cât şi a factorilor de creştere cu rol în vindecarea unor afecţiuni (**Tabel 14)**.

Factori de stimulare hematopoietică

Elementele figurate din sânge sunt vitale pentru viaţă şi îndeplinesc multiple roluri: transportă oxigen și dioxid de carbon, contribuie la imunitatea organismului și facilitează coagularea sângelui. Procesul de diferenţiere a celulelor precursoare imature din măduva osoasă în celule sanguine mature, funcționale, este controlat prin multiple mecanisme de reglare, ce permit înlocuirea celulelor pierdute prin activități fiziologice, în caz de hemoragie sau distrugere. Procesul de generare și maturare a celulelor sanguine se numeşte **hematopoieză**. Hematopoieza este mediată de o serie de factori de creștere hematopoietică (HGF), care acționează individual și în diverse combinații. Medierea implică mecanisme complexe de feedback care rezultă în stimularea, proliferarea, diferențierea și funcționarea celulelor hematopoietice.

Au fost identificate cel puţin zece tipuri de celule sanguine mature, derivate din celulele hematopoietice primordiale din măduva osoasă. Acest rezervor primordial de celule stem pluripotente cuprinde aproximativ 0,1% din celulele nucleate ale măduvei osoase și 5% din aceste celule pot fi active concomitent. Rezerva de celule stem se menține, aparent fără epuizare, prin diviziune celulară. Când are loc diviziunea unei celule stem, o celulă fiică rămâne în starea iniţială, iar celelalte devin unităţi formatoare de colonii (CFU). CFU proliferează la o frecvență mai mare și au o capacitate limitată de auto-reînnoire, comparativ cu celulele hematopoietice pluripotente.

Proliferarea și diferențierea sunt reglate de o serie de factori, inclusiv HGF. Aceştia transformă în cele din urmă celulele CFU într-o populație de celule diferențiate, celulele funcționale. Celulele angajate în calea mieloidă pot da naştere:eritrocitelor, trombocitelor, monocitelor şi macrofagelor, granulocitelor (neutrofile, eozinofile, și bazofile) şi mastocitelor. Celulele angajate în calea limfoidă pot să se diferenţieze în limfocite B sau T şi plasmocite.

HGF sunt în general glicoproteine, care se pot distinge prin secvenţa aminoacizilor și modelul de glicozilare. HGF recombinaţi nu sunt întotdeauna glicoproteine, fragmentele glucidice fiind uneori înlocuite cu alte structuri, cu condiţia exercitării activităţii biologice specifice. Fiecare HGF este codificat de o genă specifică. Producerea proteinelor recombinate se realizează prin identificarea genei respective, izolarea, clonarea şi inserarea acestei gene de interes într-un plasmide, iar apoi exprimarea proteinei de interes într-un sistem biologic (celule de bacterii, drojdii, sau mamifere) pentru a produce factori de creștere recombinaţi. Astfel de HGF recombinaţi includ:

- Factori leucocitari: factorul de stimulare a coloniilor (CSF) granulocitare (G-CSF), factorul stimulator al coloniilor granulocite şi macrofage (GM-CSF);
- Factori eritrocitari: eritropoietine (EPO) și darbepoetina alfa;
- Factori trombocitari: trombopoietina (TPO), factorii de creștere și dezvoltare a megacariocitelor (MGDF) și IL-11;
- Factori de stimulare a celulelor stem (SCF).

Factorii de stimulare a coloniilor (CSF). Izolarea şi dezvoltarea biofarmaceuticelor bazate pe HGF a schimbat substanţial îngrijirea pacienţilor care primesc chimioterapie mielosupresivă. Doi agenţi care susţin maturarea neutrofilelor, G-CSF şi GM-CSF sunt larg acceptaţi. G-CSF şi GM-CSF sunt două glicoproteine de 174 aminoacizi, şi respectiv de 127 aminoacizi. GM-CSF promovează diferenţierea precursorilor mieloizi în granulocite, monocite şi eozinofile mature. De asemenea, stimulează creşterea precursorilor hematopoietici pluripotenţi. GM-CSF recombinat accelerează refacerea mieloidă după transplant autolog de măduvă osoasă. G-CSF stimulează creşterea şi diferenţierea precursorilor neutrofilici. Administrarea G-CSF poate scurta perioada de neutropenie asociată supresiei medulare indusă de chimioterapie (Foote, 2008). G-CSF şi GM-CSF recombinate aflate în uz terapeutic: **filgrastim** (Nivestim, Zarzio, Accofil, Gratofil, Granix, Filgrastim Hexal, Ratiograstim, Tevagrastim, Neupogen), **pegfilgrastim** (Fulphila) şi **sargramostim** (Leukine). **Lenograstim** şi **molgramostim** încă nu au primit autorizarea de punere pe piaţă în UE şi SUA.

Eritropoietina (EPO), este o polipeptidă alcătuită din 165 aminoacizi, conţine două legături disulfidice şi trei lanţuri laterale. Pentru realizarea activităţii biologice *in vivo*, EPO necesită glicozilarea, proces care duce la creşterea greutăţii moleculei de la 18,4 kDa (forma neglicozilată) la 34 kDa (forma glicozilată). Constituie principalul reglator al eritropoiezei, induce maturarea eritrocitară în celulele precursoare şi creşte rata de eliberare a reticulocitelor din măduva osoasă. EPO este produsă de rinichi şi ficat ca răspuns la hipoxie. Eritropoietina recombinată este benefică în tratamentul deficitelor cum ar fi anemia în insuficienţa renală cronică. Anemia de diverse grade apare la pacienţii cu chimioterapie, studiile clinice demonstrând eficienţa moderată a EPO în ameliorarea acestei forme de anemie, la cel puţin 2 luni de folosire. Totuşi, mulţi pacienţi cu cancer suferă de anemie din cauza bolii cronice, aceasta fiind asociată cu un răspuns slab la eritropoietină, astfel încât este puţin probabil să beneficieze de pe urma acestui tratament (Foote, 2008). EPO recombinate aflate în uz terapeutic sunt **epoetina alfa** (Abseamed, Epogen, Procrit), **pegepoetina**

(Mircera, Biocrit)**, epoetina beta** (Neorecormon)**, darbepoetina alfa** (Aranesp)**, epoetina tetha** (Biopoin, Eporatio) şi un biosimilar de epoietină alfa denumit **epoetina zeta** (Retacrit, Silapo).

Trombopoietina (TPO) este o glicoproteină identificată împreună cu factorul de creștere și dezvoltare a megacariocitelor (MGDF) ca citokine ce susţin maturizarea megacariocitelor şi producţia plachetelor sanguine. **Romiplostim** (Nplate, Amgen) este o proteină de fuziune dimerică produsă în *E. coli*, fiecare monomer constând din două domenii de legare a receptorului TPO şi regiunea Fc a IgG-1 umane, indicată în tratamentul trombocitopeniei. Medicamentul eltrombopag (Revolade, Novartis, GSK) nu este un produs biofarmaceutic ci o moleculă sintetică ce acţionează ca inhibitor al receptorilor TPO, indicat pacienţilor cu purpură trombocitopenică imună cronică. Ambele sunt medicamente orfane.

Rolul **interleukinelor** în stimularea creşterii şi diferenţierii precursorilor hematopoietici multipotenţi, la fel ca şi a precursorilor seriei eritrocitare, mieloide şi megacariocitare a condus la investigarea lor în aceste indicaţii terapeutice. IL-11 este o citokină multifuncţională, regulator-cheie al multor evenimente în hematopoieză, în special stimularea maturării megacariocitelor. De asemenea, este cunoscută sub numele de factorul inhibitor al adipogenezei. Interleukina 11 este comercializată ca o proteină terapeutică numită **oprelvekin** (Neumega, Pfizer), pentru prevenirea trombocitopeniei severe la pacienții cu cancer.

Factorul de stimulare a celulelor stem (SCF) stimulează proliferarea timpurie a celulelor hematopietice şi non-hematopoietice. Acţionează şi prin stimularea altor HGF (G-CSF, GM-CSF, EPO, MGDF şi IL-2). SCF este produs în stroma măduvei osoase. **Ancestim** (Stemgen, Amgen) este o proteină recombinată obţinută cu ajutorul celulelor transformate de *E. coli*, prin urmare neglicozilată. Medicamentul a fost aprobat în Canada, Australia şi Noua Zeelandă.

Alţi factori de creştere

Factorii de creştere asemănori insulinei (IGF) sau somatomedinele sunt două molecule asemănătoare proinsulinei. IGF-1 şi IGF-2 au activități pluripotente, reglând creșterea, activarea, diferențierea și menținerea stării diferențiate a unei largi varietăți de tipuri de celule. Au rol important în dezvoltarea fătului, organogeneză, creştere longitudinală, reînnoire şi reparare tisulară (vindecarea rănilor). Sunt secretaţi mai ales de ţesutul hepatic şi funcţionează autocrin şi paracrin. IGF-1 este implicat în dezvoltarea organismului, mediind indirect hormonul somatotrop hipofizar, într-o axă hormonală. Proteina umană recombinată **mecaserim** (Increlex, Ipsen Pharma) este un IGF-1 uman recombinat, indicat copiilor cu deficienţe de creştere sau deleţie a genei *rGH*.

Factorii de creştere ai fibroblastelor (FGF) sunt o familie de peste 20 de proteine ce induc o serie de răspunsuri mitogene, chemotactice şi angiogene. **Palifermin** (Kepivance, Swedish Orphan Biovitrum) este un factor de creștere a keratinocitelor uman recombinat, indicat în tratamentul mucozitei severe la pacienţii oncologici.

Factorii de creştere ai endoteliului vascular (VEGF) sunt proteine ce stimulează formarea vaselor de sânge. Funcția normală a VEGF este de a crea noi vase de sânge în timpul dezvoltării embrionare, în urma unor leziuni, ori generarea circulației colaterale în cazul vaselor blocate. Concentrația serică de VEGF este ridicată în astm bronșic și diabet zaharat. Tumorile solide nu pot creşte dincolo de o anumită dimensiune în lipsa vascularizaţiei, iar cancerele care pot exprima

VEGF sunt capabile să crească şi să metastazeze. Supraexprimarea VEGF poate provoca boli vasculare în retină şi alte organe. Medicamente pe bază de anticorpi monoclonali (bevacizumab, ranibizumab) sau acizi nucleici (pegaptanib) pot inhiba VEGF contribuind la controlul sau încetinirea evoluţiei acestor boli. **Aflibercept** (Eylea, Bayer) este o proteină de fuziune constând din domeniul de legare a ligandului extracelular ale receptorului VEGF fuzionat la IgG Fc, produsă în celule CHO, indicată în degenerescenţa maculară. Aceeaşi substanţă comercializată de Sanofi sub denumirea Zaltrap este destinată tratamentului în cancer colorectal metastatic.

Factorii de creştere a nervilor (NGF) sunt neurotrofine, citokine ce reglează dezvoltarea, menţinerea şi supravieţuirea neuronilor, atât în sistemul nervos central cât şi în cel periferic. Unii sunt sintetizaţi în neuronii senzitivi, alţii în alte tipuri de celule, cum ar fi mastocitele. În organism generează efecte multiple şi diverse, fiind implicaţi în răspunsul imun, proliferarea celulelor pancreatice, stimularea ovulaţiei şi cascada de reacţii hormonale ce stimulează sentimentele euforice şi romantice. NGF sunt extrem de vizaţi de industria biofarmaceutică în vederea dezvoltării medicamentelor pentru prevenţia şi terapia bolilor neurodegenerative. Produsul **cenergermin** (Oxervate, Dompé Farmaceutici) este un factor neutrofic recombinat aprobat în anul 2017 în UE. Formulat sub forma picăturilor oftalmice, este indicat în keratită neutrofică, o boală degenerativă a corneei cauzată de lezarea nervului trigemen. Medicamentul este studiat pentru alte aplicaţii precum sindromul ochilor uscaţi, retinită şi glaucom.

Tabel 14. Biofarmaceutice bazate pe factori de creştere recombinaţi.

Factori de creştere umani recombinaţi	**Denumire**	**Indicaţii terapeutice**
G-CSF	Filgrastim, Pegfilgrastim Lenograstim	Neutropenie febrilă indusă de chimioterapie, neutropenie cronică severă, anemie aplastică; susținerea hematopoiezei după transplantul de măduvă osoasă; suport în chimioterapie; consolidare pentru leucemie mielogenă; mobilizarea celulelor stem pentru transplant; prevenirea infecțiilor la bolnavii cu HIV/SIDA
GM-CSF	Sargramostim Molgramostim	Sprijin pentru hematopoieză după chimioterapie şi după transplantul de măduvă osoasă; mobilizarea celulelor stem pentru transplant. Utilizați în caz de eșec al transplantului de măduva osoasă
EPO	Epoetin alfa, Epoetin beta, Darbepoetin alfa	Anemie asociată cu insuficiență renală cronică; tratamentul simptomatic al anemiei la pacienții predializați; creşterea disponibilității preoperatorii de sânge autolog în programe de donare; anemie determinată de zidovudină la pacienții cu HIV / SIDA; anemie indusă chimioterapic
TPO	Romiplostim	Trombocitopenie
IL-11	Oprelvekin	Prevenirea trombocitopeniei severe și de reducere a transfuziilor de trombocite după chimioterapie
SCF	Ancestim	Împreună cu filgrastim pentru a crește mobilizarea celulelor stem pentru transplant autolog
IGF	Mecaserim	Deficienţe de creştere la copii
FGF	Palifermin	Mucozită orală severă la pacienţi oncologici
Proteine de fuziune VEGF-IgG	Aflibercept	Degenerescenţă maculară Cancer colorectal metastatic
NGF	Cenegermin	Keratită neutrofică

9.4. Derivaţii din sânge

9.4.1. Factori de coagulare a sângelui

Procesul de coagulare a sângelui are o componentă celulară (trombocitele) şi una proteică (circa 30 de factori ai coagulării), activate într-o suită de procese derulate în cascadă. Din punct de vedere biochimic, coagularea are loc în momentul precipitării fibrinogenului (factorul I al coagulării), care se transformă în fibrină, o substanță insolubilă care formează o rețea. Mecanismul coagulării implică activarea, aderența și agregarea trombocitelor, precum și depunerea și maturarea fibrinei. Tulburările coagulării conduc fie la hemoragii, fie la tromboze.

Hemofilia este o genopatie hemoragică rară, transmisă de către femei, afectând în special descendenţa masculină, prin transmiterea unei tare purtate pe cromosomul X. Cele mai frecvente două forme clasice de hemofilie sunt cauzate de deficitul unuia din cei doi factori esenţiali pentru formarea tromboplastinei plasmatice:
A. Hemofilia de tip A (deficit de factor VIII al coagulării – globulină antihemofilică A);
B. Hemofilia de tip B (deficit de factor IX al coagulării).

Prevalenţa la băieţi a hemofiliei A este de 1:5.000, iar a hemofiliei B de 1:40.000 de nou-născuţi (Castaman şi Matino 2019). Tratamentul transfuzional pune numeroase probleme: rămâne scump, pot să apară anticorpi circulanţi antiA sau antiB şi există riscul contaminării. Factorii coagulării sunt macromolecule complexe, de aceea sinteza chimică este complicată şi se obţin prin biotehnologii şi prin tehnici de inginerie genetică.

Factorul VIII al coagulării (F VIII) poate fi extras din plasmă, într-o suită de etape:
1. Crioprecipitarea derivaţilor din plasma umană;
2. Inactivarea virală prin tratament termic sau chimic;
3. Cromatografia pe schimbători de ioni pentru îndepărtarea contaminanţilor proteici, eliminarea solvenţilor şi a detergenţilor, concentrarea F VIII;
4. Filtrarea şi adăugare de stabilizator, rezultând F VIII derivat din plasmă ce conţine şi factor von Willebrand (rol stabilizator).

Sau
3. Cromatografie de imunoafinitate (captarea F VIII pe anticorpi monoclonali);
4. Cromatografie adiţională;
5. Filtrare prin dializă, stabilizator, rezultând F VIII derivat din plasmă, imunopurificat.

Izolarea genelor care codifică producerea factorilor coagulării a deschis calea producerii acestora prin inginerie genetică:
- Introducerea genei ce codifică sinteza F VIII uman în microorganisme şi producerea proteinei dorite prin fermentaţie;
- Introducerea genei ce codifică sinteza F VIII uman în culturi de celule (CHO, BHK) şi exprimarea acesteia prin producerea proteinei dorite;
- Obţinerea de animale transgenice (vaci, capre, oi) cu scopul obţinerii F VIII uman în lapte. Inconvenient: prezenţa proteazelor;

- FVIII uman recombinat prin stabilizarea cu sucroză în locul albuminei umane.

În UE sunt disponibile 13 produse biofarmaceutice pe bază de F VIII sub diverse denumiri: **octocog alfa** (Advate, Helixate, Kovaltry, Iblias, Kogenate), **octocog alfa conjugat cu PEG** (Adynovate), **moroctocog alfa** (ReFacto), **turoctocog alfa** (NovoEight), **efmoroctocog alfa** (Elocta), **simoctocog alfa** (Vihuma, Nuwiq), **lonoctocog alfa** (Afstyla), **susoctocog alfa** (Obizur), **rurioctocog alfa pegol** (Adynovi).

Factorul IX al coagulării (F IX) se obţine în prezent prin sinteza genei ce codifică factorul IX, inserarea acesteia în linii celulare producătoare şi sinteza în bioreactoare, metodă ce prezintă unele avantajele:

- Producerea independentă de sânge şi produşi derivaţi din sânge;
- Nu se utilizează proteine umane sau animale;
- Purificarea nu necesită anticorpi monoclonali, proteine umane sau animale;
- Stabilitatea factorului IX recombinat conduce la formularea fără utilizarea albuminei sau a altor proteine umane sau animale.

Sunt disponibile 5 produse biofarmaceutice pe bază de F IX sub diverse denumiri: **nonacog alfa** (Benefix), **nonacog gamma** (Rixubis), **nonacog beta pegol** (Refixia), **albutrepenonacog alfa** (Idelvion), **eftrenonacog alfa** (Alprolix), produşi în linii celulare CHO, BHK sau HEK.

Alţi factori ai coagulării au fost obţinuţi prin inginerie genetică şi ingineria proteinelor. **Eptacog alfa** (NovoSeven) este indicat în unele forme de hemofilie, **trombina** (Recothrom) conţine F II uman recombinat şi este indicată pentru controlul sângerării în operaţii chirurgicale, **caridecog** (Novothirteen) se adresează deficitului congenital de F XIIIa (produs în *S. cerevisiae*). Medicamentul pe bază de **factor X recombinat inactivat – zhzo** (Andexxa) a fost aprobat pentru pacienţii trataţi anterior cu rivaroxaban sau apixaban (anticoagulante), pentru reversia efectului acestora. Recent a fost lansat şi un produs ce conţine **factorul recombinat uman von Willebrand** (Vonvendi).

În ceea ce priveşte hemofilia, ţelul final este reprezentat de vindecarea prin transferul unei gene normale la pacienţii hemofilici, care ar deveni astfel capabili să producă proteine de coagulare. Rezultatul aşteptat a fost atins în anul 2011, când a fost raportată tratarea cu succes a hemofiliei B folosind terapia genică. Investigatorii au introdus gena *F9* într-un vector adeno-asociat, care are o predilecție pentru ficat, unde se produce factorul IX. Vectorul rămâne în afara cromosomilor, astfel încât nu perturbă alte gene. Soluţia conţinând virusul de transducţie a fost perfuzată intravenos. Pentru a preveni respingerea, pacienții au primit tratament cu steroizi cu scopul suprimării răspunsului imun. În anul 2013, s-a raportat că la doi ani după tratarea a șase persoane cu hemofilie prin administrarea virusului adeno-asociat modificat genetic, toţi pacienţii încă produceau factorul de coagulare a sângelui.

9.4.2. Medicamente anticoagulante

Deși formarea cheagurilor de sânge este esențială pentru menținerea hemostazei, coagularea inadecvată poate conduce la complicaţii medicale grave, uneori letale. Formarea unui agregat fibrino-plachetar (tromb) poate obstrucționa parțial sau complet fluxul de sânge și, prin urmare,

oxigenarea țesuturilor deservite. Tromboza coronariană poate cauza atacul de cord, caracterizat prin decesul (infarctul) muşchiului deprivat de oxigen; de aici termenul de infarct miocardic. Dezvoltarea unui tromb într-un vas de sânge care alimentează creierul poate avea ca rezultat accidentul vascular cerebral. În plus, desprinderea fragmentelor din cheaguri de sânge formate în sistemul circulator poate obstrucționa fluxul sangvin în alte organe, proces denumit embolie.

Anticoagulantele sunt substanțe care pot preveni coagularea sângelui şi, prin urmare, utilizarea terapeutică este recomandată atunci când există un risc crescut de coagulare. Acestea sunt adesea administrate la pacienții cu boală cardiacă coronariană și la pacienții care au suferit un atac de cord, pentru prevenirea episoadelor recurente. De asemenea sunt aplicate probelor de sânge la recoltare, înainte de efectuarea testelor de diagnostic (**Tabel 15**).

Tabel 15. Principalele substanţe anticoagulate obţinute biotehnologic (după Walsh, 2007).

Agent anticoagulant	Structura chimică	Masa moleculară (kDa)	Surse
Heparina	Glucozaminoglican	3-40	Plămân de bovine, mucoasă gastrică porcină, inginerie genetică
Hirudina	Polipeptidă	7	Salivă de lipitoare, inginerie genetică
Ancrod	Polipeptidă	35	Venin de viperă, inginerie genetică
Proteina C	Glicoproteină	62	Plasmă umană, inginerie genetică

Heparina

Heparina, un heparan sulfat cu rol anticoagulant, este produsă în special de mastocite endoteliale şi stocată intracelular sub formă de granule. Odată eliberată în fluxul sangvin, heparina se leagă și activează antitrombina. Complexul heparină-antitrombină leagă apoi o serie de factori de coagulare activați (IIa, IXa, Xa, XIa și XIIa), inactivându-i. Apoi, heparina se disociază și se combină cu o altă moleculă de antitrombină, inițind astfel o altă rundă a acestui ciclu inhibitor.

Biotehnologia a parcurs un traseu lung, evoluând în eliminarea necesității de a furniza medicamente recoltate din surse animale, însă heparina a fost o excepție. Heparina bovină a fost permisă până în anii 1990, când utilizarea sa a fost întreruptă din cauza preocupărilor legate de encefalopatia spongiformă bovină. De atunci, producţia globală a medicamentului se bazează pe utilizarea heparinei porcine obţinute în China, ce constituie circa 80% din materia primă la nivel Global. Consumul de heparină este enorm, în SUA fiind estimat la 300.000 de doze zilnic (Glass 2018)

Producerea de **heparină recombinată** implică un nivel ridicat de complexitate, întrucât heparina este sintetizată într-o cale metabolică complexă care implică peste 20 de enzime. Polizaharidele heparinei sunt produse în mod unic în mastocite, dar mastocitele sunt deosebit de dificil de propagat și întreținut. Firma Tega Therapeutics a dezvoltat o tehnică de producţie a heparan sulfatului în linia de celule CHO. Modificări genetice suplimentare vizează reducerea unor substructuri de legare a proteinelor, de exemplu, pentru legarea factorului plachetar 4 (citokină eliberată de trombocitele activate în timpul coagulării), pentru a reduce riscul de trombocitopenie indusă de heparină.

Hirudina

Hirudina este o polipeptidă de 65 aminoacizi, extras din saliva lipitorilor (*Hirudo medicinalis*). Efectul anticoagulant se datorează legării şi inactivării trombinei. Două produse

biofarmaceutice pe bază de **hirudină recombinată** exprimată în *Saccharomyces cerevisiae* au fost aprobate pentru comercializare în anul 1997: lepirudina (Refludan, Celgene Europe/Bayer) şi desirudina (Revasc, Canyon Pharmaceuticals). Producţia ambelor medicamente a încetat, fiind retrase de pe piaţă în 2012 şi respectiv 2014.

Antitrombina

Antitrombina este cel mai abundent inhibitor natural al coagulării, un inhibitor de serinprotează. Este o glicoproteină cu un singur lanț de 432 aminoacizi, care prezintă patru catene laterale oligozaharidice, având o masă moleculară aproximativă de 58 kDa. Este prezentă în plasmă la concentrații de 150 µg / ml și este un inhibitor potent al trombinei (factorul IIa), precum și al factorilor IXa și Xa, exercitând acţiuni inhibitorii şi asupra factorilor XIIa, XIa şi a complexului factor VIIa şi factor tisular. Inhibă trombina prin legarea directă a acesteia. Concentratul antitrombinei derivate din plasmă a fost utilizat în terapie încă din anii 1980 pentru tratamentul deficienței de antitrombină, ereditară și dobândită (Walsh 2007).

Antitrombina umană recombinată exprimată în laptele caprinelor transgenice este prima biomoleculă obținută într-un animal transgenic, aprobată pentru uz medical în UE din anul 2006. Atryn (rEVo Biologics) are o secvență de aminoacizi identică cu cea a antitrombinei umane native, deși compoziția oligozaharidică diferă de cea a moleculei native. Secreţia proteinei recombinante în laptele unui animal transgenic este posibilă prin generarea unui vector de exprimare conținând gena codificatoare a proteinei de interes fuzionată cu elemente de reglare a lactaţiei şi introducerea constructului în linia germinativă a speciei de producție

Un produs asociat conţinând **drotrecogin alfa** (Xigiris, Eli Lilly) a fost de asemenea aprobat pentru uz medical. Drotrecogin alfa este o proteină C activată, o moleculă umană recombinată care joacă un rol important în controlul coagulării *in vivo*. Produsul recombinat este obţinut într-o linie celulară de mamifere, fiind indicat în tratamentul sepsisului sever, pentru a preveni insuficienţa multiplă de organe care poate fi declanșată de formarea cheagurilor de sânge. Medicamentul a fost ulterior retras voluntar de compania producătoare, din cauza eficacităţii limitate.

9.4.3. Agenţi trombolitici

Depunerea de fibrină și trombocite în sistemul vascular conduce la boli tromboembolice, care sunt responsabile pentru o rată considerabilă a mortalităţii și morbidităţii. Terapia trombolitică timpurie poate reduce mortalitatea, îmbunătățind permeabilitatea arterei coronare la pacienții cu infarct miocardic acut. În timpul fibrinolizei, plasminogenul zimogen inactiv este convertit enzimatic la forma sa activă, plasmina, care, la rândul său digeră matricea de fibrină insolubilă a unui tromb în produsul de degradare, fibrina solubilă. Plasminogenul este o glicoproteină implicată în procesul de dizolvare a trombului intravascular. Pentru a putea fi activ, acesta este convertit în plasmină de către urokinază, streptokinază sau de către activatorul tisular al plasminogenului.

Activatorul tisular al plasminogenului (t-PA) prezintă specificitate pentru fibrină, cu minimum de fibrinogenoliză sistemică, deci cu efecte secundare reduse. T-PA endogen este o serin protează sintetizată de către celulele endoteliale vasculare ca o polipeptidă cu un singur lanț de 527

de aminoacizi, având masa moleculară de 64 kDa. Există două tipuri de tPA nativ, t-PA I şi t-PA II, care diferă prin câteva legături din cadrul moleculei. În timpul fibrinolizei, lanțul polipeptidic t-PA este scindat între Arg275 și Ile276 de către plasmină, rezultând două lanţuri bicatenare t-PA (Modi 2008).

Biofarmaceuticele de primă generaţie cu funcţie de activatori ai plasminogenului sunt enzimele trombolitice streptokinaza şi urokinaza. Acestea activează plasminogenul circulator liber la plasmină și degradează nespecific fibrinogenul și alți factori de coagulare. Prin urmare, provoacă fibrinoliza sistemică care poate conduce la hemoragii. A doua generaţie de activatori sunt anistreplaza (amestec echimolar de streptokinază şi plasminogen uman acilat) şi alteplaza (t-PA recombinat exprimat în linii celulare CHO). Medicamentele de generaţia a treia includ variante modificate ale t-PA recombinat, cu proprietăți structurale și funcționale îmbunătățite: timp de înjumătățire mai lung, rezistență la inhibitori, siguranță și eficacitate îmbunătățită, specificitate crescută pentru fibrină. Astfel sunt reteplaza exprimată în celule de *E. coli* şi tenecteplaza exprimată în linii celulare CHO (Adivitiya şi Khasa 2017).

Alteplaza (Activase, Roche/Genentech) lansată în anul 1987 este un agent trombolitic identic cu t-PA uman endogen produs în celule CHO. Este indicată în scopul gestionării infarctului miocardic la adulți, pentru îmbunătățirea funcției ventriculare după un infarct, reducerea incidenței insuficienței cardiace congestive, reducerea mortalității asociate cu infarctul miocardic acut și pentru gestionarea emboliei pulmonare acute masive la adulți. De asemenea, este indicat pentru tratamentul în caz de de accident vascular cerebral ischemic acut, dacă tratamentul este inițiat în 3 ore de la debutul simptomelor caracteristice accidentului vascular cerebral și după excluderea hemoragiei intracraniane prin tomografie computerizată.

Reteplaza (Retavase, Chiesi; Rapilysisn, Actavis/Roche) (1996) este o variantă de activator de plasminogen recombinat, ce conţine doar 355 reziduuri de aminoacizi. Este obţinută prin deleția unor fragmente ale t-PA uman, exprimat în tulpina K2 de *E. coli* ca o peptidă cu lanţ unic, concentrată în corpi de incluziune.

Tenecteplaza (TNKase, Roche/Genentech) (2000) este un t-PA uman recombinat modificat, care are substituții de aminoacizi în trei regiuni ale moleculei ce conţine 527 de aminoacizi. Este produs în linii celulare CHO.

Eficacitatea dar şi riscurile şi efectele secundare la administrarea alteplazei, reteplazei şi tenecteplazei sunt similare. Câteva variante uşor modificate de t-PA recombinat **(lanoteplaza, desmoteplaza, pamiteplaza, monteplaza)** au parcurs etape în studii preclinice şi clinice, însă cercetările au fost abandonate din lipsa unor dovezi semnificative de eficienţă.

9.4.4. Alte molecule biofarmaceutice derivate din sânge

Câteva produse inovatoare au fost aprobate recent pentru terapia clinică a angioedemului şi pentru aderenţa vitreomaculară.

Angioedemul (edemul Quincke) este o maladie caracterizată de o inflamația rapidă a tegumentului, țesutului subcutanat, mucoaselor și submucoaselor. Poate fi ereditar sau dobândit. Angioedemul ereditar de tip I și II este o consecință a deficienței inhibitorului esterazei C1 (C1-

INH) la nivelul complementului și al sistemului kalicrein-kinină, ori a C1-INH nefuncţional, fiind determinat de o mutație în gena SERPING1. Tipul III este cauzat de creșterea cantităților de bradikinină care favorizează edemul, fiind determinat adesea de o mutație a genei factorului XII al coagulării sângelui. Angioedemul ereditar are o incidenţă de aproximativ 1:50.000. Angioedemul dobândit este cauzat fie de degradarea C1-INH la pacienții cu afecțiuni reumatologice și boli maligne limfoproliferative cu celule B, fie de inactivarea C1-INH de către anticorpi secretaţi de limfocitele B. Pentru tratamentul angioedemului ereditar sunt disponibile formule farmaceutice conţinând inhibitorul esterazei C1 derivat din plasmă umană (Cinryze şi Berinert). Icatibant este o decapeptidă sintetică care acţionează simptomatic, blocând receptorul B2 pentru bradikinină. Formularea proteinei umane recombinante a fost dezvoltată ca o alternativă la C1-INH derivată din plasmă umană pentru a elimina riscul de transmitere a agenților patogeni transmisibili prin sânge, precum și pentru a oferi o sursă fiabilă și scalabilă care nu depinde de donatorii de plasmă umană.

Ecalantida (Kalbitor, Dyax) (2009) este un medicament utilizat pentru tratamentul angioedemului ereditar şi pentru prevenirea pierderilor de sânge în chirurgia cardiotoracică. Funcţionează ca un inhibitor al proteinei plasmatice kalicreină şi fost generat prin tehnica expunerii pe suprafaţa bacteriofagilor. Metoda a permis identificarea rapidă a acestui ligand proteic specific țintei, dintr-o bibliotecă de variante concepute rațional pe baza domeniului Kunitz (domeniu activ al proteazelor) al inhibitorului căii factorului tisular (TFPI). TFPI este o polipeptidă care inhibă reversibil factorul Xa, iar complexul Xa-TFPI poate inhiba ulterior și factorul VIIa. Ecalantida este o polipeptidă de 60 aminoacizi, exprimată în celule de drojdie (*Pichia pastoris*) şi purificată prin cromatografie (Farkas şi Varga 2011).

Conestat alfa (Ruconest, Pharming Group) (2010) este un inhibitor al esterazei C1 (C1-INH) uman recombinat, o glicoproteină derivată din laptele iepurilor transgenici. Secvența de 478 de aminoacizi a C1-INH uman recombinat este identică cu cea a proteinei umane endogene, dar are diferențe în modelul de glicozilare. Proteina cu o puritate > 99% este obţinută printr-o procedură de purificare în 3 etape, incluzând cromatografia cu schimb de cationi, cromatografia cu schimb de anioni și cromatografia de afinitate. Este aprobat în UE și SUA pentru tratamentul angioedemului acut din cauza deficitului de C1-INH, la adulți și adolescenți (Riedl 2015).

În aderența vitreomaculară, corpul vitros al ochiului uman aderă puternic la retină, iar pe măsură ce ochiul îmbătrânește, corpul vitros se separă de retină. În detaşarea vitroasă incompletă, tracțiunea vitreomaculară patologică rezultată poate provoca leziuni oculare severe.

Ocriplasmina (Jetrea, ThromboGenics) (2012) este un produs biofarmaceutic indicat pentru tratarea aderenţei vitreomaculare. Ocriplasmina este o proteină recombinată, un fragment C-terminal al plasminei umane, obţinută din microplasminogen produs într-un sistem de exprimare *Pichia pastoris*. Cercetări recente indică faptul că *E. coli* ar putea fi utilizată pentru supraexprimarea ocriplasminei în corpi de incluziune (Baghban şi colab. 2021).

9.5. Enzimele

Enzimele sunt molecule proteice complexe, prezente în celulele vii, unde acţionează drept catalizatori în reacţiile biochimice ale metabolismului. Astfel, biocatalizatorii enzimatici accelerează reacțiile chimice fără a fi consumați în aceste transformări. Enzimele se pot acumula extracelular şi pot acţiona *in vitro*, capacitate exploatată în procesele industriale, în tehnologia enzimelor. Tehnologia unei enzime cuprinde producerea, izolarea, purificarea, folosirea în formă solubilă şi în final mobilizarea şi utilizarea într-o gamă largă de sisteme bioreactor. Multe enzime specifice sunt folosite din ce în ce mai mult în aplicaţii diverse: chimice, de diagnostic şi tratament. O gamă variată de enzime intracelulare de interes farmaceutic sunt acum obţinute industrial, precum glucozooxidaza – conservant, penicilinaza – conversia antibioticelor, asparaginaza – în terapia cancerului, o gamă variată de enzime pentru suplimentarea deficitului metabolic, tratarea unor maladii genetice etc.

Enzimele relevante din punct de vedere farmaceutic reprezintă o componentă importantă a industriei biofarmaceutice. Acestea sunt în general definite ca promedicamente care vizează o reacție biologică specifică reversibilă sau ireversibilă, pentru a trata o anumită boală. Principalele surse principală de enzime sunt plantele, animalele şi microorganismele. După origine se disting:
A. Enzime de origine vegetală: papaina extrasă din *Carica papaya*, bromelina din *Ananas comosus* Merr, freina din *Ficus glabrete*.
B. Enzime de origine animală: pepsina obţinută prin autodigestia mucoasei gastrice porcine, concentrată şi liofilizată.
C. Enzime de origine microbiană: cele mai avantajoase şi cu aplicaţii extrem de variate.
D. Enzime produse în linii celulare de mamifere, care pot exprima proteina în conformaţia moleculei umane native.

Obţinerea de preparate enzimatice cu ajutorul microorganismelor

Microorganismele pot fi cultivate uşor şi rapid, la un preţ de cost redus, iar astfel se pot obţine numeroase enzime utile pentru aplicaţii biotehnologice. Avantajele acestora includ caracteristici precum: activitatea specifică per unitate a produsului; producţia neinfluenţată de fluctuaţii sezoniere ale materiei prime, variaţii climatice etc; disponibilitatea unui spectru larg de acţiune al enzimei . Ingineria genetică a mărit posibilitățile de optimizare a randamentului şi spectrului de mutaţie, inducţie şi selecţie a condiţiilor de creştere, prin tehnologia ADN recombinat. Situaţia în care tulpinile microbiene recombinate nu pot exprima biomolecula dorită în conformaţia moleculară similară moleculei umane native (modificări post-translaţionale, pliere etc) poate duce la ineficienţa terapeutică sau afectarea profilului de siguranţă. Ingineria proteică poate oferi soluţii pentru unele din aceste dezavantaje.

Tulpinile selecţionate sunt păstrate prin liofilizarea culturii, iar în cazul micromicetelor nesporulate, prin păstrarea lor în azot lichid. Se prepară un număr de subculturi identice, utilizându-se o probă pentru fiecare tanc de fermentaţie. Criterii de selecţie ale microorganismelor şi proceselor de exploatare în tehnologia enzimelor:

- Să nu fie tulpini patogene;
- Să nu fie microorganisme care elaborează exo-, endo-, micotoxine (aflatoxine);
- Să nu posede activitate antibiotică şi să nu aibă potenţial alergen;
- Să producă în cantităţi mari enzima sau complexul enzimatic de interes (se preferă mutantele nerepresibile prin produsul finit);
- Să nu fie pretenţioase din punct de vedere nutriţional;
- Să elibereze enzima extracelular;
- Procesul de dezvoltare a microorganismului şi biosinteza să dureze cât mai puţin;
- Să se preteze prelucrării tehnologice facile a mediului de cultură după biosinteză, astfel încât separarea să se efectueze simplu.

Se utilizează medii de cultură simple care conţin o sursă de carbon, proteine, elemente minerale (hidrolizate de amidon, zaharoză, melasă, grâu, orz, porumb, făină de soia, făină din seminţe de bumbac, zer). Culturile sunt submerse, aerate, cu echipament convenţional pentru condiţii aseptice. Faza de creştere durează uzual 12-24 ore iar producerea enzimei este constantă până la terminarea procesului (după 50-150 ore). Adesea, enzimele se obţin în proces continuu, iar durata depinde de pierderea productivităţii microorganismului.

Cele mai utilizate enzime sunt cele care se elimină în mediul extracelular. Cultura bacteriană se îndepărtează prin filtrare, urmată de evaporarea sau ultrafiltrarea lichidului. Substanţele coloidale se îndepărtează prin floculare. Stabilizarea enzimei se realizează cu alcooli ai zaharurilor, hidrolizate de amidon. Se acceptă o pierdere a activităţii catalitice de 10% în decurs de 1 an.

În vederea purificării se utilizează fie tehnici clasice precum precipitarea cu săruri neutre, cu solvenţi organici, termoprecipitarea, precipitarea la pH izoelectric, adsorbţia fracţionată, fie cromatografia de afinitate. Enzima trebuie purificată conform cerinţelor impuse de utilizarea ei ulterioară ca biocatalizator: să nu aibă gust, substanţe toxice, microorganisme contaminante, să fie uşor de manipulat şi utilizat, să prezinte capacitate catalitică stabilă şi standardizată şi să fie rezistentă la atacul microbian.

Pentru aplicaţii practice ale enzimelor microbiene se utilizează enzime libere, imobilizate şi celule microbiene imobilizate. Cele imobilizate simplifică mult biotehnologia şi scad considerabil preţul de cost, cresc eficacitatea, protecția împotriva degradării și dezactivării, retenția enzimei, stabilitatea, permiţând reciclarea și utilizarea repetitivă sau în proces continuu (Butiuc-Keul 2014).

Utilizarea enzimelor în industria farmaceutică şi în medicină

Enzimele importante din punct de vedere industrial, cum ar fi α-amilaza, proteaza și lipaza alcalină, sunt necesare în volume mari, dar au o valoare inerentă scăzută a unității, astfel încât acestea necesită un cost de fabricare mic. Pe de altă parte, enzimele farmaceutice sunt produse în volume mai mici, la puritate mare și au costuri de producție ridicate.

În industria farmaceutică, aplicațiile majore ale enzimelor imobilizate sunt cele de bioconversie, precum producția de 6-APA utilizând penicilin amidaza imobilizată. Implementarea tehnicilor de biologie moleculară au condus la identificarea unei palete largi de enzime care au devenit necesare, printre care ADN polimeraza, endonucleazele, ligazele etc. Dezvoltarea

tehnologiei ADN recombinat a avut un efect major asupra metodelor de producție a enzimelor, iar în prezent peste 50% din piața enzimelor este asigurată de proteine recombinate.

Utilizarea enzimelor în medicină are numeroase indicaţii:
- Compensarea deficitului anumitor enzime, în insuficienţe funcţionale, dobândite sau ereditare: amilaza, celulaza, lactaza, galactozidaze, pancreatina etc;
- Îndepărtarea unor structuri denaturate sau modificate, a unor resturi de celule sau ţesuturi şi curăţarea rănilor: tripsina, chemotripsina, colagenaze;
- Liza cheagurilor de sânge: streptokinaza, urokinaza etc;
- Terapia complexă a formaţiunilor canceroase: urat oxidaza (acumulări plasmatice de acid uric), asparaginaza (leucemii);
- Maladii genetice: DNaze (fibroza chistică), glucocerebrozidaze (boala Gaucher), α-glucozidaza acidă (boala Pompe), α-galactozidaze (boala Fabry) etc;
- Eliminarea complexelor imune dezvoltate în inflamţiile asociate bolilor autoimune: serapeptaza;
- Terapii antihelmintice: cistein proteaze;
- Detoxifierea organismului: superoxid dismutaza.

9.5.1. Enzime cu rol trombolitic

Streptokinaza

Streptokinaza, o enzimă de origine bacteriană, este o proteină extracelulară de 48 kDa produsă de mai multe specii de *Streptococcus* sp. Izolarea genei care codifică streptokinaza, clonarea acesteia și exprimarea în *E. coli* au făcut posibilă producerea streptokinazei recombinate, exprimată în corpi de incluziune sau secretată extracelular. Enzima este apoi purificată, formulată și liofilizată (Walsh 2007).

Capacitatea sa de a induce liza cheagurilor de sânge se datorează legării de plasminogen şi conversiei acestuia la plasmină. Primele preparate terapeutice administrate pacienților au provocat adesea complicații imunologice, datorită impurităţilor prezente în aceste produse. Purificarea cromatografică, în special utilizând filtrarea în gel și coloane de schimb ionic, a depășit multe dintre dificultățile inițiale. Preparatele pure de streptokinază în formă liofilizată (încă obținute prin mijloace nerecombinante) conțin o cantitate de albumină ca excipient, în scopul prevenirii floculării ingredientului activ la reconstituire.

Streptokinaza este un agent trombolitic utilizat pe scară largă pentru a trata o varietate de tulburări trombo-embolice, precum: emblism pulmonar, tromboza venoasă profundă, ocluzie arterială, infarct miocardic acut. Fiind o proteină bacteriană, streptokinaza este un puternic antigen. Administrarea sa poate induce reacţii alergice de la înroşire locală până la şoc anafilactic. Un alt dezavantaj al administrării streptokinazei îl constituie riscul crescut de hemoragie. Plasminogenul activat de streptokinază este capabil să degradeze atât fibrina din cheagul de sânge cât şi fibrinogenul liber din plasmă, compromiţând astfel hemostaza.

Urokinaza

Urokinaza sau activatorul de plasminogen de tip urokinază este o serin protează produsă de rinichi și se găsește atât în plasmă, cât și în urină. Au fost izolate două variante ale enzimei: o specie de 54 kDa și una de 33 kDa. Ambele forme prezintă activitate enzimatică împotriva plasminogenului, fiind capabile să transforme proteolitic plasminogenul în plasmină. Urokinaza este utilizată clinic în aceleași condiții ca și streptokinaza; datorită originii sale umane, răspunsurile imunologice negative sunt mai puțin probabile. După evenimente medicale acute, precum embolia pulmonară, produsul este administrat în mod normal la pacient la doze inițiale mari, prin perfuzare, urmată de injecții intravenoase.

Urokinaza utilizată medical este în general purificată direct din urină umană. Este legată la o gamă de adsorbanți, cum ar fi silica gel și caolin (silicat de aluminiu hidratat), care poate fi utilizat pentru concentrarea și purificarea parțială a produsului. Poate fi, de asemenea, concentrată și purificată parțial prin precipitare folosind clorură de sodiu, sulfat de amoniu sau etanol. Pentru purificarea suplimentară a urokinazei se pot utiliza diferite tehnici cromatografice, inclusiv cromatografia cu schimb de anioni, filtrarea pe gel Sephadex și cromatografia pe coloane de hidroxiapatită. Urokinaza este o moleculă relativ stabilă, rămânând activă după incubare la 60° C timp de câteva ore sau o scurtă incubare la pH de 1 sau 10. După purificarea, filtrarea sterilă și repartizarea aseptică, urokinaza umană este supusă liofilizării. Datorită stabilității sale termice, produsul finit poate fi, de asemenea, încălzit la 60°C timp de până la 10 ore, pentru a se inactiva orice particule virale. Urokinaza poate fi, de asemenea, produsă prin tehnici de cultură în celule animale, respectiv celule renale umane sau prin tehnologia ADN recombinat (Walsh 2007).

Niveluri ridicate de exprimare a urokinazei și a altor componente ale sistemului de activare a plasminogenului se dovedesc a fi corelate cu tumori maligne. Se crede că degradarea tisulară după activarea plasminogenului facilitează invazia tisulară și, astfel, contribuie la metastază. Acest lucru face ca urokinaza să fie o țintă atractivă pentru noi medicamente și, prin urmare, inhibitorii enzimei urmează să fie utilizați ca agenți anticanceroși. Prin interacțiunea sa cu receptorul, urokinaza afectează alte câteva aspecte ale biologiei cancerului, cum ar fi adeziunea celulară, migrația și căile mitotice celulare. O strategie terapeutică inovativă o reprezintă conjugarea enzimei cu molecule citotoxice (componenta catalitică a toxinei difterice, enterotoxina de la *Pseudomonas* sp., nanobine), pentru a ţinti celule canceroase.

Stafilokinaza

Un alt agent trombolitic terapeutic, stafilokinaza, este o proteină produsă de tulpini ale bacteriei *Staphylococcus aureus*. Produsul pur este o polipeptidă de 136 de aminoacizi, care prezintă o masă moleculară de 16,5 kDa. Există şi derivați de masă moleculară inferioară, cărora le lipsesc 6 sau respectiv 10 aminoacizi terminali. Toate cele trei forme au o activitate trombolitică similară. Deși stafilokinaza nu prezintă o omologie semnificativă cu streptokinaza, ea induce un efect trombolitic printr-un mecanism oarecum similar, formând un complex stoichiometric 1:1 cu plasminogenul. Formarea complexului stafilokinază-plasminogen induce scindarea proteolitică ulterioară a plasminogenului legat pentru a forma plasmina, care rămâne la rândul ei legată la stafilokinază. Acest complex catalizează apoi conversia plasminogenului liber la plasmină, și poate

chiar accelera procesul de conversie a altor grupări stafilokinază-plasminogen în complexe stafilokinază-plasmină. Efectul net este generarea de plasmină activă, care acţionează trombolitic direct prin degradarea fibrinei din cheaguri. Proteina serică α_2-antiplasmina poate inhiba complexul plasmin-stafilokinază activat. Se pare că α_2-antiplasmina poate interacționa cu fragmentul activ de plasmină al complexului, ducând la disocierea stafilokinazei și formarea consecutivă a unei plasmin-α_2-antiplasmine (Walsh 2007).

Gena codificatoare a stafilokinazei a fost clonată în *E. coli*, precum și în diverse alte sisteme recombinate. Proteina este exprimată intracelular şi poate fi purificată, printr-o combinație de schimbători de ioni și cromatografie de interacțiune hidrofobă.

9.5.2. Diverse enzime terapeutice

Asparaginaza

Asparaginaza este o enzimă capabilă să catalizeze hidroliza L-asparaginei, producând acid aspartic și amoniac. Capacitatea ei de a inhiba proliferarea celulelor leucemice a fost aplicată cu succes pentru tratarea unor forme de leucemie umană. Majoritatea celulelor umane sănătoase sunt capabile să sintetizeze direct asparagina din glutamină. Prin urmare, asparagina este în general clasificată ca un aminoacid neesențial. Cu toate acestea, multe celule transformate își pierd această capacitatea de biosinteză. În general, concentrația plasmatică a asparaginei este destul de scăzută. Prin urmare, asparaginazele utile terapeutic trebuie să afișeze o afinitate mare faţă de substrat. A fost studiată în detaliu asparaginaza din *E. coli*, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp. și *Acinetobacter* sp., cu eficienţă dovedită în inhibarea progresiei diferitelor leucemii și a unor linii celulare transformate. Deși terapia cu asparaginază s-a dovedit eficientă, aceasta a fost asociată cu numeroase efecte secundare, datorate probabil unei deficiențe tranzitorii de asparaginază la nivelul unor țesuturi (Walsh 2007).

Două produse biofarmaceutice pe baza de asparaginază recombinată produsă în *E. coli* au fost recent aprobate în UE (2016). Ambele sunt indicate pentru tratamentul leucemiei limfoblastice şi a limfoamelor: **asparaginaza** (Spectrila, Medac Gesellschaft) şi **pegaspargaza** (Oncaspar, Baxalta Innovations), o variantă conjugată cu PEG.

Urat oxidaza

Hiperuricemia este un sindrom biochimic caracterizat prin creșterea concentrației sanguine a uratului monosodic, sare a acidului uric, ca urmare a perturbării metabolismului purinelor. Este favorizată de factori genetici, stil de viaţă, administrarea de medicamente. Enzima urat oxidază are diverse aplicații medicale pentru tratamentul hiperuricemiei acute, inclusiv asociată cu diferite tumori, în special în timpul chimioterapiei. **Rasburicaza** (Fasturtec, Sanofi) (2001) conţine urat oxidaza recombinată produsă în drojdia *Saccharomyces cerevisiae*.

Guta este o boală inflamatorie articulară cauzată de acumularea uraţilor, ce apare la 20% din pacienţii cu hipeuricemie. Pectoglicaza (Krystexxal, Savient Pharma) este o urat oxidază porcină recombinată, exprimată în *E. coli*, indicată în guta cronică tofacee. A fost retrasă de pe piaţă în anul 2016, la decizia producătorului.

9.5.3. Enzime pentru tratarea unor maladii genetice

Dezoxiribonucleaza (DNaza)

Dezoxiribonucleaza este o enzimă ce catalizează clivarea hidrolitică a legăturilor fosfodiesterice din cadrul macromoleculei de ADN, realizând astfel scindarea acesteia. Această tulburare genetică este destul de frecventă, în special în grupurile etnice provenite din nordul Europei, unde afectează 1:3.000 de nou-născuţi. Printre simptomele clinice ce caracterizează fibroza chistică predomină prezența excesului de clorură de sodiu în transpirația pacienţilor, producerea unui mucus extrem de vâscos, asemănător cremei, în diferite organe cărora le compromite grav funcția. Sunt afectaţi plămânii, pancreasul, tractul reproductiv, ficatul şi intestinul subţire. Din această cauză, bolnavii suferă adesea infecţii recurente ale tractului respirator, în special cu *Pseudomonas aeruginosa*. Ca urmare a prezenţei microorganismelor, la locul infecţiei sunt mobilizate populaţii de leucocite, în special neutrofile, şi sunt eliberate cantităţi mari de ADN, atât microbian cât şi din celulele sistemului imunitar al gazdei. Având masă moleculară mare, moleculele de ADN cresc vâscozitatea mucusului în tractul respirator.

Terapia simptomatică a pacienţilor cu fibroză chistică constă în utilizarea DNazei pentru a reduce vâscozitatea mucusului respirator. Ingineria genetică și îmbunătățirea metodologiei cromatografice au facilitat producerea de preparate cu DNază umană recombinată înalt purificată, primul produs medicamentos primind aprobarea în 1993. **Dornaza alfa** (Pulmozyme, Genentech) este o enzimă umană recombinată obţinută într-o linie de celule CHO, şi conține o secvență de nucleotide ce codifică DNaza umană nativă. După prelucrare, enzima este purificată prin filtrare tangențială, urmată de o combinație de etape cromatografice. Glicoproteina purificată de 260 de aminoacizi prezintă o masă moleculară de 37 kDa.

În prezent se încearcă descifrarea mecanismelor genetice ale acestei boli şi dezvoltarea preparatelor farmaceutice pentru terapia genică. După analizarea mutațiilor specifice şi identificarea a peste 1.500 de mutaţii în gena putativă de fibroză chistică, localizată pe cromosomul uman 7, reiese faptul că un procent semnificativ din cazuri sunt legate de mutaţii ale genei CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Molecule sintetice precum ivacaftor (Kalydeco, Vertex Pharmaceuticals) şi lumacaftor/ivacaftor (Orkambi, Vertex Pharmaceuticals) au rol de potenţiatori ai CTFR, fiind disponibile din anul 2012 respectiv 2015. O altă utilizare terapeutică a DNazei în combinaţie cu plasminogenul tisular activ (t-PA) a demonstrat o creştere a drenajului pleural, reducerea duratei de spitalizare și scăderea necesității intervenției chirurgicale în pleurezii parapneumonice şi empiem.

Glucocerebrozidaza (beta-glucozidaza)

Preparatele de glucocerebrozidază sunt administrate pentru a ameliora simptomele bolii Gaucher, afecţiune de stocare lizosomală care afectează metabolismul lipidic, în special degradarea glucocerebrozidelor. Glucocerebrozidele sunt o clasă specifică de lipide, constând dintr-o moleculă de sfingozină, un acid gras și o moleculă de glucoză. Acestea se găsesc în multe țesuturi ale corpului, în special în cel nervos, fiind adesea asociate cu teaca de mielină a nervilor. Boala Gaucher este o deficienţă genetică a metabolismului caracterizată prin lipsa enzimei glucocerebrozidază şi acumularea de glucocerebrozide, în special în macrofagele tisulare. Are o

incidenţă de 1:60.000. Este o maladie autosomală recesivă asociată unor mutaţii ale genei GBA: N370S homozigot (tipul I), L444P homozigot sau heterozigot (tipurile II şi III) ce pot fi detectate în diagnosticul prenatal. Simptomele clinice includ mărirea și funcționarea deficitară a unor organe precum ficatul, splina, ganglioni limfatici, dar și anemie, oboseală, deteriorarea oaselor lungi, manifestări neurologice şi uneori retard mental. Eliglustat (Cerdelga, Genzyme) este un compus chimic cu administrare orală, ce funcţionează ca inhibitor al glucoziltransferazei implicate în sinteza glucocerebrozidelor.

Administrarea glucocerebrozidazei exogene ca terapie de substituție enzimatică a demonstrat că reduce principalele simptome ale acestei boli. Primul medicament scos pe piaţă (Ceredase, Genzyme) era conţinea enzima cu o greutate moleculară de 65 kDa. Aceasta era extrasă din ţesuturi placentare recoltate din maternităţi, necesarul pentru tratamentul unui pacient pe timp de un an necesitând aproximativ 27.000 de placente. În anul 1994 a fost dezvoltată versiunea recombinată a β-glucocerebrozidazei umane produsă în linii celulare CHO, **imigluceraza** (Cerezyme, Genzyme). Medicamente lansate ulterior conţin **velagluceraza alfa** (VPRIV, Shire HGT) (2010) produsă într-o linie de fibroblaste sau **taligluceraza alfa** (Elelyso, Pfizer) (2012) exprimată în celule de morcov. Taligluceraza alfa constituie prima biomoleculă aprobată obţinută într-o plantă transgenică. Sistemul de exprimare ProCellEx este bazat pe celule vegetale transformate stabil cu ajutorul *Agrobacterium tumefaciens* conţinând vectorul plasmidial cu gena β-glucozidazei şi cea de rezistenţă la kanamicină. Suspensia de celule modificate genetic se cultivă în bioreactor cu alimentare continuă.

Fenilalaninhidroxilaza

Fenilcetonuria este una dintre cele mai frecvente disfuncţii ale metabolismului aminoacizilor, o boală genetică gravă determinată de mutaţii ale genei PAH, ce codifică fenilalaninhidroxilaza. Hiperfenilalaninemia afectează un nou-născut din 10.000 și este responsabilă, în absența tratamentului adecvat, de apariția unei întârzieri mintale cu instalare progresivă (oligofrenie fenilpiruvică). **Pegvaliaza-pqpz** (Palynziq, BioMarin) constituie o terapie de substituţie indicată în fenilcetonurie, aprobată în anul 2018. Conţine enzima fenilalanin-amoniac-liază recombinată, exprimată în *E. coli* şi conjugată cu PEG.

Alfa-galactozidaza

Preparatele biofarmaceutice cu α-galactozidază se administrează ca terapie de substituţie în boala Fabry, o maladie genetică manifestată prin acumularea patologică a unor particule lipidice în pereţii vaselor de sânge, cu afectarea în mod special a vaselor din piele, rinichi, inimă, creier şi sistem nervos. Incidenţa bolii este de 1:80.000 nou-născuţi, însă dacă se ia în considerare debutul tardiv, incidenţa ar putea fi de 1:3.000. Alfa-galactozidaza umană este o glicoproteină homodimerică de 100 kDa. Fiecare monomer de aminoacizi prezintă o masă moleculară de 45,3 kDa (cu excepția glicocomponentului) și este glicozilat în trei poziții.

Două α-galactozidaze recombinate sunt disponibile pe piață din anul 2001: **agalsidaza beta** (Fabrazyme, Genzyme) și **agalsidaza alfa** (Replagal, TKT Europe). Fabrazyme conţine α-galactozidaza umană recombinată produsă într-o linie celulară CHO. Procesarea în aval necesită o

combinație de cinci etape de purificare cromatografică urmate de concentrare și diafiltrare. Excipienții adăugați includ manitol și agenți de tamponare a fosfatului de sodiu, iar produsul final este liofilizat. Replagal este tot α-galactozidaza umană recombinată, produsă într-o linie celulară umană continuă. Este, de asemenea, purificat printr-o combinație de cinci etape de purificare cromatografică, deşi este comercializat ca o soluție lichidă.

Alfa-glucozidaza acidă

Alfa-glucozidaza este o enzimă lizosomală implicată direct în transformarea dizaharidelor şi polizaharidelor, inclusiv a glicogenului, în glucoză. În cazul deficitului acestei enzime, glicogenul nu este metabolizat, având loc depunerea vicioasă a acestuia, mai ales la nivelul musculaturii striate a cordului și la nivelul musculaturii netede a aparatului respirator. Acumularea excesivă de glicogen la nivel tisular determină distrofia musculară, iar progresia bolii cauzează insuficiența respiratorie, cardiomegalia, isuficiența venoasă și ischemia. Boala Pompe este o boală lizosomală sistemică ereditară rară care se transmite autosomal recesiv. Este cauzată de deficitul de alfa-glucozidază şi se manifestă prin afectare neuromusculară progresivă, debilitantă. Incidenţa este aproximată la 1:40.000 de nou-născuţi.

Alglucozidaza alfa este o alfa-glucozidaza acidă umană recombinată produsă în culturi de celule CHO, disponibilă pe piață din 2006 şi respectiv 2010 sub denumirile comerciale Myozyme şi Lumizyme (Sanofi şi Genzyme).

Lipaza acidă lizosomală

Deficitul de lipază acidă lizosomală sau boala Wolman este o maladie congenitală foarte rară, cu o incidenţă de 1:40.000-300.000. Este cauzată de mutaţii autosomale recesive ale genei LIPA, și în consecinţă afectează metabolismul colesterolului și trigliceridelor. **Sebelipaza alfa** (Kanuma, Alexion Europe) (2015) conţine lipaza acidă umană recombinată produsă în ouă de găini transgenice. Enzima este extrasă şi purificată din albuşul de ou, ce constituie materia primă pentru fabricarea medicamentului.

Alfa-manozidaza

Manozidoza alfa este cauzată de o mutație genetică autosomală recesivă în gena MAN2B1, care afectează producția enzimei alfa-D-manozidază, având ca rezultat deficiența acesteia şi tulburări de stocare lizosomală. Are o incidenţă de 1:500.000 nou-născuţi. Este o boală progresivă multisistemică, cu deteriorare neuromusculară și scheletică. **Velmanaza alfa** (Lamzede, Chiesi Farmaceutici) (2018) este o variantă recombinată a manozidazei umane, exprimată sub forma unui precursor în linii celulare CHO.

Fosfataza alcalină

Hipofosfatazia este o boală metabolică ereditară cu o severitate clinică variabilă, cu afectare osoasă. Există mai multe forme ale acestei boli, cu o incidenţă încă necunoscută. Prevalenţa

hipofosfateziei severe este estimată la 1:300.000 în populaţia europeană. Este cauzată de mutațiile genei care codifică fosfataza alcalină tisulară nespecifică (TNSALP), iar în prezent se cunosc peste 200 de mutaţii asociate acestei boli. **Asfotaza alfa** (Strensiq, Alexion Europe) (2015) este o proteină de fuziune dimerică ce conține un domeniu catalitic solubil al fosfatazei alcaline tisulare nespecifice umane, legat de un domeniu IgG Fc și un domeniu peptidic deca-aspartat, produsă în celulele CHO.

Enzime lizosomale implicate în mucopolizaharidoze

Mucopolizaharidele (MPS) sunt formate din glicozaminoglicani ataşati la o proteină de legătură cu un miez de acid hialuronic. Enzimele lizosomale degradează aceste macromolecule în componente mai mici. Heparan sulfatul, dermatan sulfatul şi keratan sulfatul sunt produşi ai degradării incomplete, iar acumularea acestora interferează funcţiile celulei. Activitatea deficientă a enzimelor lizosomale blochează procesele de degradare ale MPS, conducând la acumularea anormală de heparan sulfat, dermatan sulfat şi keratan sulfat. În funcţie de tipul şi cantitatea de substanţă acumulată, mucopolizaharidozele sunt clasificate astfel: sindrom Hurler - tip I, sindrom Scheie, sindrom Hunter - tip II, sindrom Sanfilippo - tip III, sindrom Morquio -tip IV, sindrom Maroteaux-Lamy - tip VI şi sindrom Sly - tip VII. Cea mai frecventă este mucopolizaharidoza tip IV, cu o prevalenţă de 1:5.000-10.000, celelalte tipuri având o prevalenţă estimată la 1:1.000.000 de persoane.Tratamentul specific sau vindecarea sunt limitate pentru mucopolizaharidoze. Modalităţile experimentale de tratament au condus la dezvoltarea câtorva noi biofarmaceutice disponibile comercial:

- **Laronidaza** (Aldurazyme, BioMarin) (2003) este o α-1-iduronidază produsă prin tehnologia ADN recombinat, produsă în linii celulare CHO. Este o terapie de înlocuire în mucopolizaharidoza de tip I.
- **Galsulfaza** (Naglazyme, BioMarin) (2005) conţine N-acetilgalactozamină 4-sulfatază umană recombinată, produsă în celule CHO, indicată în mucopolizaharidoza tip VI.
- **Idursulfaza** (Elaprase, Shyre Human Genetic Therapies) (2006) este o formă purificată a enzimei umane recombinate iduronat-2-sulfataza, produsă în celule CHO. Este folosită pentru a înlocui nivelul insuficient de enzimă lizosomală în mucopolizaharidoza tip II.
- **Elosulfaza alfa** (Vimizim, BioMarin) (2014) conţine N-acetilgalactozamina 6-sulfataza umană recombinată, produsă în celule CHO, indicată în mucopolizaharidoza tip IVA.
- **Vestronidaza alfa-vjbk** (Mepsevii, Ultragenyx Pharmaceutical) (2017) este o β-glucuronidază umană recombinată produsă în celule CHO, indicată în mucopolizaharidoza tip VII.

Tripeptidil peptidaza

Lipofuscinoza ceroidă neuronală sau boala Batten este o maladie ereditară foarte rară ce afectează sistemul nervos. Se cunosc cel puţin zece tipuri ale acestei tulburări genetice, cu o incidenţă greu de apreciat. În ţările scandinave este estimată la 1:45.000, iar în Germania la 1:143.000 de naşteri. Mutaţii autosomale ale genelor CLN sunt responsabile de un deficit de enzime, precum tripeptidil peptidaza 1 în cazul genei CLN2. **Cerliponaza alfa** (Brineura, BioMarin) (2017) este singura terapie de substituție a enzimei cu serin-tripeptidil-peptidaza 1 umană recombinată exprimată în linii celulare CHO ca precursor.

9.5.4. Alte enzime cu importanţă farmaceutică

Carboxipeptidazele

Glucarpidaza (Voraxaze, BTG International) este o carboxipeptidază recombinată produsă în *E. coli* şi aprobată în anul 2012 în SUA pentru intoxicaţii cu metotrexat, la pacienţii cu afectare renală. Metotrexatul este un agent chimioterapic imunosupresor indicat în tratamentul cancerelor (leucemii, limfoame, cancer pulmonar, mamar etc), al bolilor autoimune (psoriazis, artrită reumatoidă, boală Crohn), prescris în cazul sarcinilor ectopice şi pentru întreruperea medicamentoasă a sarcinii.

Hialuronidaza

Hialuronidazele catalizează degradarea acidului hialuronic, un constituent al matricei extracelulare. Ca efect, scade vâscozitatea acestuia şi creşte permeabilitatea țesuturilor. La om se cunosc cinci astfel de enzime funcţionale, codificate de genele HYAL. Deficitul de hialuronidază 1 constituie o formă rară de mucopolizaharidoză caracterizată prin depozitarea anormală a acidului hialuronic în lizosomi. Manifestările clinice includ afectarea articulară difuză cu sinovită proliferativă, apariția de mase periarticulare, statură mică și trăsături dismorfice. Prevalenţa acestei boli autosomale recesive este mai mică de 1:1.000.000.

În prezent, preparatele cu hialuronidaze sunt utilizate ca adjuvanţi pentru a creşte biodisponibilitatea medicamentelor injectabile, accelerând dispersia și livrarea acestora. De asemenea, cresc rata de absorbție a fluidelor parenterale în hipodermocliză, sunt adjuvante în urografia subcutanată pentru îmbunătățirea resorbției agenților radioopaci şi sunt utilizate pentru extravazarea soluțiilor hiperosmolare. Aplicațiile includ chirurgia oftalmică, plastică și dermatologică, pentru a inversa efectele injecțiilor cu acid hialuronic utilizate ca umpluturi dermice când pacientul nu este mulțumit de rezultate. Sunt disponibile preparate cu enzime produse de ortologi ai HYAL5, extrase din surse animale, precum ovine (Vitrase, Bausch & Lomb) sau bovine (Amphadase, Amphastar; Hydase, PrimaPharm; Hylase Dessau, Riemser Pharma etc).

Hialuronidaza umană recombinată (Hylenex, Halozyme Therapeutics) produsă ca o proteină de 61 kDa în celule CHO este indicată pentru a intensifica absorbţia şi dispersia altor substanţe medicamentoase. În prezent este evaluată ca adjuvant al biofarmaceuticelor pe bază de acizi nucleici (De Robertis şi colab. 2018).

Superoxid dismutaza (SOD)

În condiții normale, în metabolismul aerob, oxigenul este redus cu patru electroni, formând molecula de apă. Reducerea incompletă generează radicali de oxigen și alte specii reactive: radicalul superoxid O_2^-, peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și radicalul hidroxil (OH^-). Radicalii superoxid și hidroxil sunt deosebit de reactivi și pot ataca componentele membranei, acizii nucleici și alte macromolecule celulare, conducând la distrugerea sau modificarea lor. Se consideră că radicalii O_2^- și OH^- se numără printre substanțele mutagene generate de radiațiile ionizante. Organismele care utilizează oxigen au dezvoltat, în general, sisteme specifice mediate de enzime care servesc la protejarea celulei de astfel de specii reactive. Aceste enzime includ SOD și catalaza,

conţinute în general de toate organismele aerobe. Au fost identificate cel puțin trei tipuri de SOD: o dismutază eucariotă citosolică, dimer de 31 kDa, conținând atât cupru cât și zinc; o formă mitocondrială de 75 kDa și o formă bacteriană de 40 kDa, fiecare dintre acestea conținând doi atomi de mangan. Există, de asemenea, o formă care conține fier, identificată în unele bacterii, cianobacterii și plante.

La om, mutațiile din gena enzimei SOD1 pot provoca scleroză laterală amiotrofică. Generarea excesivă de O_2^- și nivelurile scăzute de SOD au fost implicate într-o gamă largă de stări patologice: îmbătrânire, astm, creștere accelerată a tumorilor, boli neurodegenerative și necroză a țesutului inflamator. Mai mult, s-a descoperit că administrarea de SOD reduce leziunile tisulare datorate iradierii sau altor condiții care generează radicali de oxigen.

Orgoteina, SOD izolată din ficat sau eritrocite bovine a fost utilizată ca agent anti-inflamator şi pentru ameliorarea efectelor secundare ale radioterapiei, însă producţia a fost sistată. SOD umană a fost exprimată în mai multe sisteme recombinate și în prezent este evaluată pentru capacitatea sa de a preveni deteriorarea țesuturilor prin expunerea la sânge cu un conţinut excesiv de oxigen. Este comercializată în suplimente alimentare.

Polichetid sintetazele

Polchetid sintetazele (PKS) sunt enzime complexe care produc o gamă variată de metaboliţi secundari din precursorii acil CoA. PKS sunt responsabile de biosinteza multor produse naturale regăsite în bacterii, ciuperci și plante. Sunt secretate de celule capabile să producă molecule de interes precum antibiotice (macrolide precum eritromicina, claritromicina, azitromicina; tetracicline precum doxiciclina; ansamicine precum rifamicina), antifungice (amfotericina, nistatina, pimaricina), antihelmintice (avermectina, ivermectina), chimioterapice (doxorubicina), imunosupresante (tacrolimus, sirolimus sau rapamicina) și statine (lovastatina, simvastatina). O serie de PKS sunt utilizate în procese de bioconversie pentru obţinerea multor medicamente importante din punct de vedere clinic.

9.5.5. Enzime utile ingineriei genetice şi biologiei moleculare

Tehnologia ADN recombinat a permis transferul genelor enzimei de interes de la un organism la altul. Ingineria moleculară a proteinelor este folosită pentru a modifica performanţa moleculelor enzimei. În tehnologia ADN recombinat un rol cu totul deosebit îl au o serie de enzime care au fost studiate pe parcursul mai multor decenii: endonucleaze de restricţie, ADN ligazele, ADN polimerazele, revers-transcriptazele, polinucleotid kinazele, transferaza terminală, exonucleazele, fosfataza alcalină etc. În mod particular, trei tipuri de enzime stau la baza metodei generale de a izola şi propaga o moleculă de ADN recombinat: endonucleazele de restricţie, ADN ligazele şi ADN polimerazele.

Endonucleazele sunt un grup de enzime ce catalizează hidroliza legăturilor fosfodiester între două nucleotide din moleculele de acizi nucleici. Ribonucleazele scindează ARN iar dezoxiribonucleazele scindează moleculele de ADN.

Endonucleazele de restricție sunt enzime care scindează molecula de ADN dublucatenar într-un punct specific, recunoscut pe baza unei secvenţe specifice de nucleotide. Această secvență este de obicei un palindrom (secvența se citește la fel în direcţia 5' - 3' pe fiecare catenă). De exemplu, 5' - GG^CC - 3' este secvența recunoscută de *Hae*III, (simbolul ^ arată unde va fi tăiat ADN-ul). Enzime de restricție se găsesc în mod natural în bacterii, fiind folosite de acestea ca sistem de apărare împotriva acţiunii invadatoare a ADN-ului viral. Denumirea provine de la organismul din care sunt izolate, printr-un cod de 3 litere, prima litera semnificând genul, iar celelalte două specia bacteriană de la care a fost izolată enzima (spre exemplu, *Eco – Escherichia coli; Hae – Haemophilus aegyptius; Hin – Haemophilus influenzae*); în unele cazuri, o a patra literă, o majusculă, indică tulpina bacteriană (ex: *Eco*R). Dacă o anumită tulpină bacteriană are mai mult de un sistem de restricţie-modificare, acestea se notează prin cifre romane. Au fost identificate 3.700 de endonucleaze, care recunosc numai 230 de situsuri diferite (Popescu şi Zarnea 2011), multe fiind disponibile comercial. Unele endonucleaze de restricţie, numite izoschizomere, recunosc și taie în aceeași secvență de ADN.

ADN ligazele servesc la inserarea fragmentului de ADN în vectorul de clonare. Ligaza leagă covalent grupările fosfat ale moleculei de ADN cu capete coezive compatibile, îndeplinind un rol natural de reparare a catenelor moleculei de ADN. Reacția de ligare se desfăşoară în trei etape:

- Crearea unui intermediar ligază-adenilat, printr-o legătură fosfoamidică între un reziduu de lizină și o moleculă AMP a cofactorului enzimei (ATP sau NAD^+);
- Transferul AMP la capătul 5'-fosfat al ADN, rezultând ADN-adenilat;
- Îmbinarea celor două polinucleotide și eliberarea de AMP.

ADN polimerazele sunt enzime esențiale în procesul replicării ADN. În ingineria genetică, vectorul recombinat este introdus într-o celulă gazdă care îl multiplică în numeroase cicluri de diviziune celulară. Principala funcție a ADN polimerazelor este de a crea molecule de ADN din nucleotide, pentru a genera două duplexuri identice dintr-o singură moleculă inițială de ADN. La fiecare diviziune a unei celule, ADN polimerază dublează ADN-ul celulei. În felul acesta, informația genetică este transmisă din generație în generație. La crearea unei noi molecule de ADN, fiecare catenă a moleculei parentale serveşte drept matriţă pentru sinteza unei catene noi. ADN polimeraza adaugă nucleotide doar la capătul 3' al catenei nou formate. Acest proces generează noul helix, creat în direcția 5' - 3'. Nicio ADN polimerază nu poate începe un nou lanț *de novo*, doar poate adăuga o nucleotidă unui grup 3' -hidroxi preexistent. De aceea, enzima are nevoie de o amorsă (primer) la care să adauge prima nucleotidă. În replicarea ADN, primele două baze sunt întotdeauna ARN și sunt sintetizate de o enzimă numită primază. O enzimă numită helicază desparte cele două lanțuri complementare de ADN, pentru a facilita replicarea fiecărei catene, după modelul semiconservativ al replicării ADN.

Reacţia PCR este o metodă de amplificare enzimatică *in vitro* a unei anumite secvenţe de ADN. A fost dezvoltată o adevarată tehnologie PCR care este folosită într-o varietate de domenii: biologie moleculară, medicină, ştiinţele mediului, criminalistică, biotehnologie, microbiologie, industria alimentară, epidemiologie etc. Din punct de vedere chimic, reacţia PCR este constituită din cicluri succesive de replicare ADN *in vitro*, folosind două amorse oligonucleotidice ce hibridizează cu cele două catene ale secvenţei originale, folosită ca matriţă în replicare. Diferenţa esenţială între o asemenea reacţie de replicare şi un proces de replicare ADN *in vivo* îl reprezintă faptul că în reacţia PCR etapa de denaturare a helixului matriţă şi respectiv cea de ataşare a

amorselor nu sunt catalizate enzimatic, ci prin parcurgerea unor trepte de temperatură, iar singura enzimă folosită în reacţie este o ADN polimerază ADN-dependentă, cu funcţie de replicază. Primul experiment de amplificare *in vitro* a unei secvenţe ADN prin PCR a fost raportat de Kary Mullis în 1985. Initial, reacţia PCR folosea ca replicază fragmentul mare al ADN polimerazei I (*Klenow*) de la *Escherichia coli*. Această enzimă era însă inactivată de temperaturile ridicate necesare etapei de denaturare a matriţei. Ca urmare, la fiecare ciclu de replicare trebuia adaugată enzimă proaspătă. Ulterior, a fost descoperită şi introdusă în reacţia PCR o ADN polimerază termostabilă (polimeraza *Taq*) izolată dintr-o tulpină de *Thermus aquaticus*, bacterie termofilă izolată din izvoarele termale Yellow Spring din SUA.

ADN polimeraza face greşeli o dată la fiecare un miliard de baze copiate. Unele ADN polimeraze pot corecta aceste greşeli. Rolul de exonuclează al enzimei permite eliminarea bazei greșite. După eliminare, polimeraza poate introduce baza corectă și replicarea continuă. Mai multe ADN polimeraze izolate din organisme termofile prezintă activitate exonucleazică 3′ - 5′, fiind capabile de corectură, ceea ce creşte fidelitatea reacţiei. Printre acestea, ADN polimeraza *Pfu* din archebacteria *Pyrococcus furiosus*, polimeraza *Tli* (*Thermococcus litoralis*) şi polimeraza *Pow* (*Pyrococcus woesei*) au o rată de eroare de peste zece ori mai mică comparativ cu polimeraza *Taq*.

Revers-transcriptaza (ADN polimeraza dependentă de ARN, transcriptaza inversă) permite sinteza ADN monocatenar complementar (ADNc) pe baza unei matriţe de ARN. Revers-transcriptazele se întâlnesc în mod natural în retrovirusuri şi în unele virusuri ADN, facilitând integrarea în genomul gazdei şi replicarea. Recent au fost descoperite în celulele procariote şi eucariote, facilitând integrarea retrotranspozonilor, iar telomerazele din celula eucariotă conţin o componentă ARN şi o revers-transcriptază. Inhibitorii revers-transcriptazelor sunt utilizaţi în terapia antivirală (zidovudina, lamivudina, tenofovir, nevirapin). În biologia moleculară servesc metodei transcrierii inverse cuplată cu reacţia polimerazică în lanţ (RT-PCR): revers-transcriptaza *Tth* (*Thermus thermopilus*), MonsterScript (Epicentre), Thermo-X (Invitrogen) şi altele (Rittié şi Perbal 2008).

Nucleazele şi editarea genomului. Manipularea de mare precizie a genomului constituie o necesitate nu numai pentru dezvoltarea terapiei genice, ci şi pentru cercetarea şi dezvoltarea medicamentelor în general. Tehnologiile de editare genetică sunt importante pentru identificarea rolului anumitor gene în starea de boală, validarea ţintelor terapeutice sau crearea unor linii celulare şi modele animale. Trei tipuri de nucleaze sunt utilizate în prezent în astfel de intervenţii: nucleazele *zinc finger* (ZFN), nucleazele efectoare de tip activator de transcripție (TALEN, *transcription activator-like effector nuclease*) şi nucleazele Cas.

Nucleazele ZFN sunt endonucleaze artificiale care constau dintr-o proteină *zinc finger* proiectată, fuzionată cu domeniul de clivaj al enzimei de restricție *Fok*I. Endonucleaza de restricție *Fok*I (de la *Flavobacterium okeanokoites*) constă dintr-un domeniu de legare a secvenţei N-terminale a moleculei de ADN și un domeniu de clivaj ADN-nespecific la capătul C-terminal. Odată ce proteina este ataşată prin intermediul domeniului său de legare de ADN dublucatenar la locul de recunoaștere 5' – GGATG - 3', domeniul de clivaj al ADN-ului este activat și scindează, fără alte specificități de secvență, prima catenă la 9 nucleotide situate în aval și a doua catenă la 13 nucleotide în amonte de cea mai apropiată nucleotidă a situsului de recunoaștere. Domeniile *zinc finger* pot recunoaște o secvență de 3 nucleotide, iar o serie de domenii înlănţuite pot recunoaște

secvențe de ADN mai lungi, oferind specificitatea dorită la țintă. Motivele *zinc finger* aliniate într-o matrice influențează specificitatea domeniilor învecinate, ceea ce face proiectarea și selecția ZFN provocatoare și consumatoare de timp, fiind dificil de prezis specificul aranjamentului final. Endonucleaza *Fok*I funcționează ca un dimer, clivarea ADN dublucatenar având loc numai prin legarea a două ZFN la catenele opuse. Sistemul se bazează pe două ZFN proiectate pentru a recunoaște diferite secvențe de nucleotide situate îndeaproape în cadrul situsului țintă și necesită recunoașterea și legarea simultană a ambelor ZFN, ceea ce limitează efectele în afara țintei.

Nucleazele TALEN sunt proteine de fuziune ale unui efector de tip activator de transcripţie (TALE) bacterian cu endonucleaza *Fok*I. Similar cu ZFN, specificitatea țintei provine din asocierea proteinei cu molecula de ADN. În cazul TALEN, un motiv TALE recunoaște o singură nucleotidă și o serie de efectori TALE se pot asocia cu o secvență mai lungă. Activitatea fiecărui domeniu TALE este limitată la o singură nucleotidă și nu afectează specificitatea de legare a motivelor învecinate, ceea ce simplifică ingineria proteinelor TALEN comparativ cu ZFN. În mod similar ZFN, efectorii TALE sunt legaţi de endonucleaza *Fok*I, care necesită dimerizare pentru a scinda molecula ADN. Aceasta înseamnă că este necesară legarea a două enzime TALEN diferite la catenele opuse, în imediata apropiere a țintei.

Nucleazele Cas ale sistemului CRISPR-Cas se bazează pe sistemul bacterian de apărare împotriva ADN exogen. Sistemul programat să modifice genomul celulei eucariote a fost aplicat pentru prima oară în anul 2013 (Cong şi colab. 2013). Tehnologia este compusă cel mai adesea din nucleaza Cas9, o moleculă sintetică de ARN ghid (ARNg) necesar direcţionării şi exprimării enzimei, urmat de un motiv ADN conservat cu o lungime de 2-5 pb (*protospacer-adjacent motif*, PAM). ARNg recunoaște secvența țintă pe baza complementarităţii bazelor, fiind compus fie din două molecule sintetice, ARN CRISPR activat trans (ARNtracr) și ARN CRISPR (ARNcr), fie dintr-o singură moleculă ce cuprinde secvenţele ARNtracr şi ARNcr fuzionate, denumit în acest caz ARN ghid singular (ARNsg). Fiecare proteină Cas9 are o secvență PAM specifică, de exemplu 5' - NGG - 3', pentru enzima Cas9 standard. Nucleaza Cas9 de tip sălbatic scindează dublul helix, iar variantele mutante ale Cas9 denumite *nickaze* doar o singură catenă ADN. Recunoașterea situsului ADN de către sistemul CRISPR-Cas9 este controlată de interacțiunile ARN-ADN, ceea ce oferă multe avantaje față de ZFN și TALEN: proiectarea simplă pentru orice țintă genomică, predicția cu privire la situsurile în afara țintei și posibilitatea de a modifica simultan mai multe situsuri genomice în editarea multiplex. Noile variante ale nucleazelor Cas, precum cele din sistemele CRISPR-Cas12 și CRISPR-Cas13a pot recunoaște diferite secvenţe PAM, diversificând opțiunile de editare precisă a genomului. O alternativă interesantă o reprezintă fuziunea Cas9 cu endonucleaza de restricţie *Fok*I, ceea ce combină avantajele sistemelor ZFN / TALEN și CRISPR-Cas9. Au fost dezvoltate de asemnea proteine himerice Cas9, unele fără activitate nucleazică (Li şi colab. 2020).

9.6. Hormonii

Încă de la debutul lor, tehnologiile de inginerie genetică au fost folosite cu succes pentru obţinerea hormonilor necesari în terapiile de substituţie. Aceste metode au permis obţinerea unor

cantităţi de substanţă care, prin metode tradiţionale de extracţie, ar fi implicat costuri ridicate, materii prime insuficiente, diverse riscuri asociate prelucrării produselor animale sau sângelui uman etc. Insulina umană recombinată, molecula de aur a acestei tehnologii, a primit aprobarea de comercializare în anul 1982, iar de atunci multe biomolecule hormonale au fost dezvoltate, precum şi o serie de produse biosimilare. În prezent, piaţa anuală a biofarmaceuticelor reprezentate de hormoni este de circa 2 miliarde de dolari.

9.6.1. Insulina

Insulina constituie o medicaţie de substituţie în diabetul juvenil şi la adulţi, în formele severe de diabet. Nicolae Paulescu, profesor al Universităţii de Medicină şi Farmacie din Bucureşti, este cel care a descoperit, în anul 1921, insulina. El a denumit pancreină acest principiu antidiabetic secretat de pancreas. Paulescu a demonstrat eficienţa acestei substanţe în reducerea glicemiei şi a folosit insulina în tratarea diabetului. Rezultatele cercetărilor au fost publicate în revista de specialitate *Archives Internationales de Physiologie*, sub titlul *Recherches sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive*. Enciclopediile îi prezintă însă, la acest capitol, pe doi canadieni, Frederick Banting şi Charles Best, care au reuşit să izoleze insulina şi să o folosească în tratarea unui pacient. Procesul de fabricație a fost ulterior dezvoltat pentru extragerea insulinei din pancreasul de porcine și bovine. Mai apoi, eforturile au urmărit creşterea purităţii insulinei și optimizarea formulării pentru controlul eficient al nivelului glucozei în sânge. Condiţiile de prelucrare şi purificare au fost optimizate iar extracţia îmbunătățită. Metodele moderne de cromatografie au contribuit la reducerea gradului de impurificare cu proteine asemănătoare insulinei, cum ar fi polimeri ai proinsulinei și insulinei. Dificultățile legate de imposibilitatea obținerii unor cantități suficiente de pancreas bovin sau porcin, împreună cu preocupările legate de encefalopatia spongiformă transmisibilă asociată cu utilizarea materiei prime de origine animală, precum şi riscurile legate de dezvoltarea rezistenţei organismului receptor la insulina de substituţie au condus la limitarea producerii insulinei de provenienţă animală.

Insulina umană recombinată a fost prima moleculă de aur a industriei biotehnologiei şi rezultatul direct al tehnologiei ADN recombinat. În prezent, milioane de diabetici din întreaga lume folosesc insulina obţinută biotehnologic cu ajutorul bacteriilor sau drojdiilor. Prin combinarea tehnologiei ADN recombinat cu metodele noi de purificare, se poate furniza insulină cu un grad de puritate mai mare de 98%. De asemenea, au fost dezvoltaţi analogi de insulină cu farmacologie îmbunătățită.

Insulina este o proteină alcătuită din 51 de aminoacizi, sintetizată sub forma precursorului **proinsulina b** de către insulele Langerhans. Precursorul este convertit la insulină prin clivaj enzimatic ce conduce la excizarea din moleculă a peptidei de legătură (lanţul C) care leagă lanţurile A şi B. Rezultă molecula de insulină, care este compusă din două lanţuri polipeptidice conectate prin două legături disulfidice intercatenare. Lanţul A compus din 21 de aminoacizi şi lanţul B compus din 30 de aminoacizi sunt interconectate prin punţi disulfidice între aminoacizii A7-B7 și respectiv A20-B19. Există şi o a treia legătură disulfidică intracatenară, situată în lanţul A, între resturile A6 și A11. Frederick Sanger, dublu laureat al Premiului Nobel pentru Chimie, a a descifrat structura insulinei, obţinând secvenţa aminoacizilor din cele două lanţuri în anul 1953, ceea ce a condus ulterior la sinteza moleculei.

Insulina produsă de către celulele pancreatice este eliberată discontinuu, fie ca răspuns la consumul de alimente, fie ca insulină bazală secretată între mese şi în cursul nopţii. Insulina acționează împreună cu glucagonul pentru a echilibra metabolismul, intervenind chiar în procesele senzoriale şi în cele cognitive. În general, insulina favorizează reacțiile anabolice, favorizând depozitarea de energie și producerea de proteine. În metabolismul glucidic, insulina asigură creşterea depozitelor de glicogen şi scade glicogenoliza hepatică. În metabolismul proteic favorizează sinteza proteinelor în muşchi şi scade proteoliza, iar în metabolismul lipidic stimulează sinteza trigliceridelor şi scade lipoliza prin inhibarea lipazei din adipocite. Când insulina lipseşte sau se găseşte în organism în cantitate scăzută, glucoza nu mai este consumată. Drept sursă de energie este folosit ţesutul adipos. Apare astfel diabetul zaharat tip I, dependent de aportul exogen de insulină.

Insulina recombinată a intrat pe piaţă în anul 1982. Abordarea inițială a producției de insulină recombinată are la bază două metode (insulina crb şi insulina prb). Mai nou, diverşi analogi de insulină umană recombinată sunt produşi ca proteine de fuziune.

A. Insulina crb (*chain, recombinant DNA, bacteria*) se obţine prin:

1. Inserarea secvenței de nucleotide care codifică lanțurile A şi B ale insulinei în două culturi diferite de *E. coli*;
2. Cultivarea acestor tulpini transformate în vase de fermentație separate;
3. Purificarea cromatografică ulterioară a lanțurilor de insulină produsă;
4. Incubarea celor două tipuri de lanțuri împreună, în condiții de oxidare adecvate pentru a promova formarea legăturii disulfidice intercatenare, rezultând insulina umană biosintetică sau **insulina crb**.

B. Insulina prb (*proinsulin, recombinant DNA, bacteria*) se obţine prin:

1. Inserarea secvenței de nucleotide care codifică proinsulina umană într-o tulpină de *E. coli*;
2. Cultivarea tulpinii transformate în vase de fermentație;
3. Purificarea cromatografică a proinsulinei produse;
4. Excizarea proteolitică a peptidei C *in vitro*, rezultând insulina umană biosintetică sau **insulina prb** (Walsh 2007).

Formulări farmaceutice ale insulinei recombinate

Insulina formulată ca preparat injectabil se găseşte pe piaţă în flacoane de 10 ml, cu o concentraţie standard de 40 sau 100 unităţi/ml. O unitate de insulină terapeutică se defineşte ca fiind cantitatea necesară pentru a scădea glicemia la iepure, pe nemâncate, la 45 mg/100ml. Pentru preparatele purificate, unitatea se raportează la greutate, iar 1 mg de insulină standard conţine 24-28 de unităţi. Optimizarea formulării farmaceutice urmăreşte creşterea stabilităţii. Pentru a prelungi biodisponibilitatea, se recurge la generarea suspensiilor de insulină din forma solubilă, prin adăugarea de zinc 0,4% pentru a promova formarea unor cristale, sau de protamine pentru a realiza complexe proteice. Au fost produşi o multitudine de analogi ai insulinei cu farmacocinetică diferită, capabili să interacţioneze cu receptorii pentru insulină. Tipurile de molecule dezvoltate şi formulate au ca scop controlul glicemiei prin mai multe strategii:

1. Insulina regular are o formulare simplă, neutră şi prezintă o activitate maximă a insulinei după 2-3 ore, cu o durată maximă de 6-8 ore.

2. Insulina cu profil rapid de acţiune realizează activitate maximă după aproximativ o oră. Au fost concepute şi formulări solubile care pot fi utilizate în pompe externe sau implantate. Astfel de molecule, analogi ai insulinei umane native sunt:

- Insulina lispro, obţinută prin schimbarea poziţiilor lizinei şi a prolinei (poziţiile 28 şi 29 din structura lanţului B);
- Insulina aspart, în molecula căreia prolina a fost înlocuită cu aspartat în poziţia 28 a lanţului B;
- Insulina glulizină, ce conţine lizină în poziția B3 în locul asparaginei, iar lizina din poziția B29 este înlocuită cu acid glutamic.

3. Insulina cu acţiune intermediară prezintă o stare latentă de 1-2 ore şi o durată de acţiune de 18-26 ore, aceasta variind in funcţie de doză, locul injectării şi temperatură. Iniţial a fost formulată ca insulină lente, dar acesta nu se mai utilizează. Medicamentele disponibile comercial conţin:

- Insulina NPH (proteină neutră Hagedorn), co-cristalizată cu protamina. Poate fi amestecată *ex tempore* cu insulina regular în raport de 70/30 sau 50/50, oferind un mai bun control al glicemiei;
- Insulina glargin este obţinută prin înlocuirea asparaginei cu glicină în poziția 21 a lanțului A și prin extinderea carboxi-terminală a lanțului B cu 2 reziduuri de arginină. Nu se recomandă utilizarea în amestec cu alte tipuri de insulină;
- Insulina detemir este un analog al insulinei, un acid gras (acidul miristic) fiind legat de aminoacidul lizină în poziția B29.

4. Insulina cu acţiune prelungită are o durată de acţiune îndelungată. Iniţial a fost formulată ca insulina ultralente, cu o durată de acţiune de 28-36 de ore, însă aceasta nu mai este disponibilă comercial. Au fost dezvoltaţi compuşi noi, precum insulina degludec, un analog de insulină obţinut prin îndepărtarea treoninei din poziţia B30 și conjugarea cu acid hexadecandioic la aminoacidul lizină în poziția B29. Insulina degludec este singura moleculă cu profil ultralung, acţionând până la 42 de ore.

Cercetările pentru obţinerea de noi formulări şi combinaţii au fost şi sunt de mare interes. Dintre produsele biofarmaceutice exceptând anticorpii monoclonali, medicamentele pe bază de insulină recombinată sunt cele mai vizate pentru dezvoltare, având o cotă mare de piaţă. Un număr record de 12 produse biofarmaceutice pe bază de insulină au fost lansate pe piaţă în anii 2014-2018 (Walsh 2018). A existat şi un medicament cu acţiune ultrarapidă (2007) datorită administrării prin inhalare (Exubera, Pfizer), însă produsul a fost retras de producător în anul 2008 din cauza cererii insuficiente. În prezent, un număr de 24 de medicamente pe bază de insulină recombinată sunt disponibile comercial în UE şi SUA:

- **Insulină umană recombinată** produsă în *E. coli* (Humulin, Eli Lilly; Insuman, Sanofi; Affreza, ManKind);
- Analogi recombinaţi ai insulinei produşi în *E. coli*: **insulină lispro** (Humalog, Eli Lilly şi biosimilarul insulina lispro Sanofi, Sanofi-Aventis; Admelog, Sanofi), **insulină aspart** (NovoRapid, Novo Nordisk), **insulină glargin** (Optisulin şi Lantus, Sanofi; Toujeo, Sanofi; Abasalagar, Eli Lilly; Lusduna, Merck Sharp & Dohme), **insulina glulizină** (Apidra, Sanofi), combinaţia **insulină glargin/lixisenatid** (Suliqua, Sanofi-Aventis);
- Analogi recombinaţi ai insulinei produşi în *S. cerevisiae:* **insulină aspart** (Novomix, Novolog, Novolog mix şi Fiasp, Novo Nordisk), **insulină detemir** (Levemir, Novo Nordisk),

insulină degludec (Tresiba, Novo Nordisk), combinaţiile **insulină degludec/insulină aspart** (Rayzodeg, Novo Nordisk), **insulină degludec/liraglutidă** (Xultophy, Novo Nordisk);

- Analogi recombinaţi ai insulinei produşi în *Pichia pastoris:* **insulină glargin** (Semglee, Mylan).

Două medicamente inovatoare lansate recent (Suliqua şi Xultophy) au în compoziţie un analog al insulinei umane recombinate împreună cu un agonist al receptorului GLP-1 (peptida-1 de tip glucagon, *glucagon-like peptide-1*). Substanţele active din aceste formulări, insulina glargin şi respectiv insulina degludec, au efect lung şi respectiv ultralung. Produsă ca proteină de fuziune, insulina glargin este cea mai des prescrisă medicaţie pe bază de insulină.

Agoniștii receptorului peptidei-1 de tip glucagon (GLP-1)

Agoniștii receptorului GLP-1 sunt o nouă clasă de medicamente, utilizată pentru tratamentul diabetului de tip 2. Acționează similar hormonului incretinic GLP-1, adică reduc glucoza din sânge prin stimularea secreției de insulină și prin scăderea secreției de glucagon de către pancreas. Unul dintre avantajele antagoniştilor receptorului GLP-1 faţă de tratamentele convenţionale este că prezintă un risc mai mic de a provoca hipoglicemie, iar aceste noi proteine combat efectul hipoglicemiant nocturn al terapiei îndelungate cu antidiabetice. Sunt destinaţi tratamentului pacienţilor adulți cu diabet, pentru a îmbunătăți controlul glicemic în combinație cu antidiabetice orale, atunci când acestea singure sau combinate cu insulină bazală sau insulina bazală singură nu asigură un control glicemic adecvat. Molecule precum liraglutida şi semaglutida sunt indicate şi în obezitate. Astfel de agonişti ai GLP-1 sunt:

- **Liraglutida** (Saxenda şi Vicroza, Novo Nordisk) produsă în *S. cerevisiae*. Este comercializată şi în combinaţie cu insulină degludec (Xultophy, Novo Nordisk).
- **Lixisenatida** comercializată în combinaţie cu insulină glargină (Suliqua, Sanofi-Aventis).
- **Albiglutida** (Eperzan, GSK) este alcătuită din două copii ale GLP-1 uman modificat, fuzionat cu albumina umană. Proteina recombinată este exprimată în *S. cerevisiae*.
- **Dulaglutida** (Trulicity, Eli Lilly) este o proteină de fuziune alcătuită dintr-un analog al GLP-1 uman legat de domeniul Fc al IgG şi produsă într-o linie celulară de mamifere.
- **Semaglutida** (Ozempic, Novo Nordisk) este un agonist al receptorului GLP-1 uman produs în celule de drojdie şi legat covalent de un acid gras.

În SUA, produsele proteice care au fost aprobate ca medicamente, sunt autorizate ca produse biologice în conformitate cu noile reglementări FDA începând cu data de 23 martie 2020. Aceste modificări vizează insulina, somatotropina, hialuronidaza şi pancrelipaza.

9.6.2. Glucagonul

Glucagonul este un alt hormon pancreatic implicat în reglarea echilibrului glicemic, alături de insulină. Este secretat de celulele alfa ale insulelor Langerhans, atunci când nivelul glicemiei scade prea mult. Glucagonul este o polipeptidă alcătuită din 29 de aminoacizi. Glucagonul are efect hiperglicemiant, stimulând transformarea rezervelor hepatice de glicogen în glucoză, care este

eliberată în sânge (glicogenoliza) şi sinteza glucozei din acizi graşi şi glicerol (guconeogeneza). Un deficit de glucagon reflectă pierderea de ţesut pancreatic, afectarea tumorală sau alte cauze.

Două produse pe bază de **glucagon uman recombinat** sunt disponibile pe piaţă încă din anul 1998, unul produs în *E. coli* (Glucagon, Eli Lilly) şi altul în *S. cerevisiae* (Glucagen, Novo Nordisk). Pentru produsul Glucagen, procesarea în amonte şi anume fermentaţia aerobă alimentată în șarje este urmată de o ajustare a pH-ului mediului pentru dizolvarea produsului precipitat (glucagonul este insolubil în intervalul de pH 3-9,5). Acest lucru facilitează îndepărtarea ulterioară a drojdiei prin centrifugare, iar proteina este apoi recuperată și purificată din mediu printr-o serie de precipitări suplimentare și separări cromatografice de înaltă rezoluție.

9.6.3. Hormonul somatotrop hipofizar

Hormonul somatotrop hipofizar (STH, hormonul de creştere, somatotropina) produs de glanda pituitară este un hormon polipeptidic, alcătuit din 191 de aminoacizi în forma matură a moleculei. Stimulează creșterea și reproducerea celulelor. STH este un hormon de stres care creşte concentrația de acizi grași liberi și glucoză, stimulând producţia de IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), un hormon asemănător insulinei. Deficitul de STH are o varietate de efecte negative la diferite vârste; de exemplu, la nou-născuţi, simptomele primare pot fi hipoglicemie şi micropenis, iar mai târziu se manifestă prin deficit de creștere. Deficienţa la adulți este rară şi se manifestă prin diminuarea masei musculare, scăderea densităţii oaselor și o serie de simptome psihologice precum memorie slabă, retragere socială și depresie. Alte tulburări hormonale coincid frecvent cu hiposecreţia hormonului de creștere. Originea deficitului de STH poate fi congenitală sau dobândită, iar cea mai frecventă cauză o reprezintă tumorile hipofizare.

Deficiența de STH poate fi tratată prin suplimentarea hormonului de creștere cu preparate injectabile. Până 1985, hormonul de creștere pentru tratamentul deficitului de STH a fost obținut prin extracție din glandele pituitare umane colectate la autopsie. Din anul 1987 sunt disponibile preparate biofarmaceutice (în prezent zece) pe bază de **hormon de creștere uman recombinat**, obţinut ca o proteină intracelulară, cu ajutorul unor tulpini modificate de *E. coli*, denumit **somatotropină** (Humatrope, Eli Lilly; Nutropin, Roche/Genentech; Tevtropin, Teva Pharmaceuticals; Norditropin, Novo Nordisk; Genotropin, Pfizer; Omnitrope, Sandoz; Accretropin, Emergent Biosolutions). Somatotropina a fost obţinută şi în celule de şoarece C127 (Saizen şi Serostim, EMD Serono). Aceste medicamente sunt indicate în deficienţei de STH la copii, dar şi în cazul deficitului de creştere asociat sindromului Turner.

Somatrem (Protropin, Genentech) a fost primul produs farmaceutic cu STH recombinat. A fost lansat în anul 1985, concomitent presiunii create de suspendarea producerii hormonului pituitar în SUA, ca urmare a înregistrării unor cazuri de maladii prionice, precum boala Creuzfeldt-Jacobs, asociate tratamentelor cu acest hormon. Somatrem a fost retras de pe piaţă în anul 2004.

Inițial, STH se administra sub formă de injecții intramusculare de trei ori pe săptămână, dar administrarea subcutanată zilnică s-a dovedit a fi mai eficientă. În ciuda îmbunătățirilor derulate în designul dispozitivelor de injectare, injecțiile subcutanate zilnice rămân incomode, dureroase și dificile pentru mulţi pacienţi, ceea ce conduce la nerespectarea tratamentului, la reducerea

eficacităţii și la creșterea costurilor pentru sănătate. Pentru a surmonta aceste probleme, au fost dezvoltate o varietate de formulări cu acțiune prelungită.

Un medicament este disponibil pentru a trata acromegalia: **pegvisomant** (Somavert, Pfizer), antagonist al STH uman recombinat conjugat cu PEG, produs în *E. coli*.

Hormonul de creștere bovin recombinat

Hormonul de creștere bovin recombinat (rBGH sau somatotropina bovină recombinată) a fost obţinut în laborator în anul 1981 (Genentech şi Monsanto) şi lansat în anul 1994 (Posilac, Monsanto). Unele produse aflate pe piață sunt analogi ai BGH şi diferă din punct de vedere chimic de molecula nativă a somatotropinei bovine. Hormonul stimulează producția de lapte prin creșterea nivelului unui alt hormon, şi anume IGF-1. Preocupările legate de eventuale efecte asupra sănătății omului rezultate de consumul laptelui produs folosindu-se rBGH s-au axat pe două aspecte principale:

1. Dacă laptele provenit de la vaci tratate cu rBGH poate crește nivelul sangvin de hormon de creștere sau IGF-1, reprezentând astfel un risc pentru sănătatea consumatorului. Rezultatele cerecetărilor indică următoarele:
- Utilizarea hormonului de creștere bovin nu atinge un nivel semnificativ mai ridicat în laptele vacilor tratate cu rBGH;
- BGH nu este activ la om, astfel încât, chiar dacă ar fi absorbit din laptele de consum, nu ar fi de așteptat să provoace efecte asupra sănătății;
- Nu este pe deplin clarificat faptul că laptele de consum, produs cu sau fără tratament rBGH, ar crește concentraţia IGF-1 în sânge până la un nivel de alertă în ceea ce privește riscul de cancer sau alte efecte asupra sănătății.

2. Întrucât vacile tratate cu rBGH au tendinţa de a dezvolta mastită, acestea sunt mai des tratate cu antibiotice. Se pune astfel problema selecţiei bacteriilor rezistente la antibiotice, o problemă de sănătate pentru om încă insuficient examinată. Studiile ulterioare au infirmat asocierea dintre rBGH şi un risc crescut de mastită.

Cu toate că FDA, WHO şi NIH au concluzionat independent că produsele lactate provenite de la bovine tratate cu rBGH sunt sigure pentru sănătatea consumatorilor, acest hormon a fost interzis uzului veterinar în UE, Canada, Australia, Noua Zeelandă, Japonia, Israel şi Argentina.

9.6.4. Gonadotropinele şi gonadosteroizii

Biotehnologiile farmaceutice au contribuit în mod substanţial la intervenţia umană asupra funcţionării sistemului reproducător, prin dezvoltarea tratamentelor hormonale, a dispozitivelor de diagnostic şi a tehnicilor de investigare. Preparatele medicamentoase ce conţin hormoni sexuali au multiple aplicaţii: realizarea contracepţiei, stimularea fertilităţii, substituţia hormonală de menopauză/postmenopauză, respectiv andropauză ori tratamentele legate de schimbarea sexului. Planificarea familială reprezintă conceptul care permite atât cuplurilor cât și persoanelor în mod individual să utilizeze atât metode de control ale concepției și nașterilor pentru a anticipa și atinge numărul dorit de copii și intervalul de timp dorit între nașteri, cât și metode de tratament al

infertilităţii involuntare. Testele imunocromatografice rapide ce pot detecta momentul ovulaţiei sau sarcina în mod precis, rapid şi neinvaziv, sunt acum accesibile la nivel global. Examinările şi investigaţiile precum evaluarea calităţii materialului genetic ori a embrionilor, diagnosticul prenatal şi screeningul neonatal permit detecţia precoce a unor eventuale anomalii genetice, metabolice sau enzimatice şi astfel intervenţia medicală rapidă.

Contracepţia hormonală. Una dintre cele mai utilizate metode contraceptive moderne presupune utilizarea de către femei a contraceptivelor hormonale. Efectul contraceptiv este, după caz, datorat inhibării ovulaţiei, modificării endometrului pentru împiedicarea implantării zigotului, precum şi îngroşării mucusului la nivelul colului uterin pentru îngreunarea trecerii spermatozoizilor în cavitatea uterină şi în trompele uterine. După modul de administrare, acestea pot fi:

- Contraceptive orale combinate - preparate de estrogeni şi progesteron, cu eficacitate crescută în prevenirea sarcinii şi respectiv preparate cu progestageni, fără estrogeni;
- Implante subdermice cu un progestagen asemănător progesteronului natural uman;
- Contraceptive injectabile ce conţin un progestagen sau un progestagen şi un estrogen;
- Dispozitive intauterine (sterilet) hormonale, care eliberează progesteron.

Fertilizarea *in vitro* (FIV) este o componentă a reproducerii umane asistate medical şi reprezintă ansamblul tehnicilor și practicilor clinice şi biologice care permit procrearea în afara procesului natural, prin intervenția și la indicația medicului. Tehnicile de reproducere asistată medical sunt utile atunci când tratamentele medicamentoase sau chirurgicale nu dau rezultat. Aceste practici au luat amploare deoarece rata sterilității și infertilității cuplurilor este în creștere. Există mai multe metode de reproducere umană asistate medical și practici asociate acestora: inseminarea artificială, fertilizarea *in vitro*, transferul de embrioni, mama purtătoare sau de substituție.

Etapele FIV:

1. Selectarea pacientelor cu infertilitate;
2. Inducerea creşterii foliculare: stimularea prin mijloace hormonale;
3. Colectarea de ovule;
4. Cultura de embrioni: colectarea şi maturarea oocitelor, prepararea şi inseminarea, fertilizarea, evaluarea calităţii embrionilor, crioprezervarea, maturarea *in vitro;*
5. Embriotransferul;
6. Susţinerea hormonală a sarcinii.

Gonadotropinele şi analogii acestora

Gonadotropinele sunt hormoni polipeptidici glicoproteici secretați de celulele gonadotropice ale hipofizei anterioare - hormonul foliculostimulant (FSH) şi hormonul luteinizant (LH), sau de sinciţiotrofoblaste şi placentă - gonadotropina corionică umană (HCG). Toți trei sunt hormoni heterodimerici care conțin o subunitate α-polipeptidică identică și o subunitate β-polipeptidică unică, ce conferă specificații biologice fiecărei gonadotropine. Sunt eliberate sub controlul hormonului eliberator de gonadotropină din hipotalamus.

FSH are rol în maturarea foliculilor primari iar LH are rol în formarea şi dezvoltarea ovocitelor. HCG, un hormon similar LH, are rol în maturarea foliculară finală și luteinizare. Tratamentul utilizat pentru stimularea ovulaţiei conţine fie FSH, fie LH, fie ambii hormoni.

Tratamentul hormonal fertilizant se adresează în special femeilor, cu scopul de a stimula dezvoltarea şi maturarea foliculilor ovarieni. Stimularea ovariană controlată are ca scop inducerea producţiei a mai mult de un ovocit de către ovare, cum se întâmplă în ciclurile naturale. Agenţii farmaceutici capabili să promoveze activitatea ovariană sunt: gonadotropine sau analogi acestora, hormoni eliberatori ai gonadotropinelor şi antagonişti (Lunenfeld şi colab. 2019).

La bărbaţi, tratamentul hormonal stimulează spermatogeneza. FSH și HCG sunt utilizaţi în tratamentul subfertilității masculine sau a afecțiunilor conexe. Ambele sunt administrate bărbaților care prezintă hipogonadism hipogonadotrofic, pentru a stimula sinteza spermei și funcția sexuală normală. HCG are o aplicare limitată în tratamentul criptorhidiei prepubertale. Capacitatea acestui hormon de a stimula producția de testosteron a atras atenția, în special în cazul sportivilor și, ca urmare, Comitetul Olimpic Internațional a interzis utilizarea acestuia.

Preparatele farmaceutice disponibile conţin fie hormoni purificaţi, fie obţinuţi prin tehnici de recombinare. Urofolitropina (Fertinex, Fostimon, Bravelle) este o formă purificată a FSH, obţinută prin extracţia acestui hormon din urină, în general de la femei aflate la menopauză, urmată de purificare şi liofilizare. Medicamentele utilizate pentru maturarea ovocitelor (Pregnyl, Ovitrelle, Profasi) conţin HCG, extrasă şi purificată din urina gravidelor. În cazul insuficienţei luteale se administrează medicamente ce conţin progesteron (Arefam, Utrogestan) sau analogi sintetici precum didrogesteron (Duphaston, Femoston).

Folitropina alfa (Gonal F, Merck Serono şi biosimilarul Bemfola, Finox Biotech), **folitropina beta** (Puregon, Merck, Sharp & Dohme; Follistim, Merck; Fertavid, Merck, Sharp & Dohme) şi mai nou **folitropina delta** (Rekovelle, Ferring Pharmaceuticals) sunt variante recombinate ale hormonului uman foliculostimulant. **Corifolitropina alfa** (Ovaleap, Teva Pharma) este un analog al FSH uman, fuzionat cu HCG umană. **Lutropina alfa** (Luveris, EMD Serono) este o hormonul luteinizant uman recombinat. Acestea sunt produse prin inginerie genetică în celule CHO, fiind printre primele biofarmaceutice de uz general aprobate în UE pentru tratarea infertilităţii. Există şi preparate farmaceutice injectabile ce conţin combinaţii precum **folitropină alfa/lutropină alfa** (Pergoveris, Merck Serono).

Coriogonadropina alfa umană recombinată (Ovitrelle, Merck Serono) formată din subunităţile α și β, prezintă o secvență de aminoacizi identică și detalii de glicozilare foarte similare cu HCG umană. Este produsă într-o linie celulară CHO și purificată prin cromatografie în mai multe etape, ultrafiltrare și nanofiltrare.

Dozarea de masă versus dozarea biologică

Gonadotropinele recombinate dispun de o activitate specifică, puritate ridicată şi conformitate garantată în toate loturile produse. Aplicarea tehnologiei recombinante a generat preparate înalt purificate. Iniţial, calibrarea produsului a fost dependentă de teste biologice bazate pe măsurarea greutății ovariene după injectarea hormonului în șobolani (*filled-by-bioassay*). Acest test este asociat cu variabilitatea măsurării activității biologice (10-20%) și a conținutului hormonal de la lot la lot. Pentru a îmbunătăți calibrarea produsului final, a fost elaborat un nou concept de evaluare în funcție de masa proteinei obţinute. Noua formulare prin dozare de masă (*filled-by-mass*) a folitropinei alfa prezintă o variabilitate foarte scăzută de la lot la lot (<2%). Avantajele acestei

formulării au fost evaluate în practica clinică. O îmbunătățire semnificativă a consistenței răspunsului ovarian raportată în ciclurile FIV este probabil să fie legată de dozarea mai precisă a loturilor. În mod similar, la pacientele tratate pentru inducerea ovulației, rata de anulare a ciclului a fost semnificativ redusă, precum și nevoia de ajustare a dozei și de monitorizare repetitivă. Mai mult, durata tratamentului și doza totală de FSH necesară pentru ciclurile cu și fără FIV au fost semnificativ reduse. În concluzie, noua formulare folitropinei alfa, prin furnizarea unei dozări mai precise a conținutului de FSH în fiecare lot, îmbunătățește semnificativ confortul și eficacitatea (Hugues şi Durnerin 2011; Winstel şi colab. 2017).

Hormonii eliberatori ai gonadotropinelor şi antagoniştii gonadotropinelor

Înainte de puncţia ovocitară se urmăreşte inhibarea ovulaţiei şi inhibarea maturării foliculare pe o anumită perioadă, prin administrarea de analogi şi/sau antagonişti ai gonadotropinelor. După o stimulare iniţială, administrarea prelungită de preparate medicamentoase ce conţin analogi sintetici ai gonadotropinelor inhibă secreţia acestora, determinând supresia funcţiilor ovariene. Antagoniştii blochează hormonul de eliberare a hormonului luteinizant (LHRH). În timpul tratamentului de fertilitate, stimularea ovariană este utilizată pentru a determina ovarele să producă mai multe ovule. Prin blocarea efectului LHRH, medicaţia antagonistă opreşte producţia de LH şi, prin urmare, previne ovulaţia prematură, care poate avea ca rezultat eliberarea unor ovule imature şi improprii pentru utilizare în cadrul unor tehnici precum FIV.

Triptorelina (Diphereline, Decapeptyl) şi acetatul de buserelină (Suprefact) sunt analogi de sinteză ai peptidei naturale LHRH. După o stimulare iniţială, administrarea lor prelungită inhibă secreţia de gonadotropine, determinând supresia funcţiilor testiculare şi ovariene. Cetrorelix (Cetrotide), ganirelix (Orgalutran, Antagon) şi leuprorelina (Lupron, Synarel) sunt peptide sintetice ce funcţionează ca antagonişti ai gonadotropinelor. Modulatorii selectivi ai receptorilor de estrogeni precum tamoxifen sau raloxifen funcţionează ca antagonişti ai estrogenilor, crescând astfel secreţia de FSH, LH şi respectiv testosteron.

Gonadosteroizii

Gonadosteroizii sunt hormoni produşi de gonade şi includ androgenii (testosteron, dihidrotestosteron), estrogenii (estradiol) şi progestagenii (progesteron). Progesteronul şi estrogenii sunt utilizaţi în combinație, în principal la femei, în terapia hormonală pentru deficitul hormonal, pentru a sprijini sarcina și fertilitatea, pentru a trata tulburări ginecologice (sindrom premenstrual, sângerări anuvolatorii, dureri etc), pentru a ameliora simptomele menopauzei, în contracepţia hormonală şi în procesul de schimbare a sexului. Testosteronul este utilizat pentru a trata hipogonadismul şi disforia de sex la bărbaţi, precum şi în procesul de schimbare a sexului. Administrarea pentru creşterea performanţelor atletice este considerată dopaj. Hormonii steroizi sunt utilizaţi de asemenea în terapia oncologică.

Gonadosteroizii fac parte din grupul steroizilor, o familie de lipide terpenoide larg răspândite în natură, care prezintă o structură comună relativ rigidă formată din patru inele aliciclice condensate, numită gonan. Starea de oxidare a inelelor nucleului de steroizi și prezența diferitelor grupări funcționale atașate determină proprietățile biologice particulare ale fiecărei molecule

steroidice, adică funcția sa biologică. Compușii steroizi joacă roluri biologice importante în organism, inclusiv stabilizarea membranei celulare și reglarea proceselor celulare precum proliferarea celulară și diferențierea țesuturilor. După descoperirea lor în anii 1950, steroizii au fost sintetizaţi prin procese chimice. În prezent, aceşti hormoni steroizi sunt produşi prin cuplarea unor etape microbiologice de fermentaţie cu etape de sinteză chimică. Biotransformarea microbiană a sterolilor oferă o serie de avantaje: funcționalizarea stereospecifică a moleculelor, reacții consecutive multiple efectuate într-o singură operație şi procese mai prietenoase cu mediul înconjurător. Sapogenine precum diosgenina extrasă din *Dioscorea* sp. au fost multă vreme utilizate ca precursori, însă ulerior au fost înlocuite de steroli naturali. Fitosterolii extraşi din soia, pin ori din deșeuri rezultate din industria hârtiei sunt utilizaţi în general ca materie primă industrială în locul colesterolului obținut din grăsimi și uleiuri animale. În acest mod se evită un laborios control al calităţii impus precursorilor de origine animală.

În general, actinobacteriile care produc acizi micolici precum cele aparţinând genurilor *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia* și *Rhodococcus* sunt capabile să metabolizeze colesterolul și alți steroli naturali, producând intermediari ai steroizilor (sintone) de interes pentru industria farmaceutică: 4-androsten-3,17-diona (AD), 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), 9α-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD). Spre exemplu, testosteronul este produs prin bioconversia AD. Prin inginerie genetică raţională, în urma inserţiei ori deleţiei unor gene au fost create tulpini mutante de *Mycobacterium* sp., *Gordonia* sp. şi *Rhodococcus* sp. capabile să producă, să acumuleze şi să mineralizeze aceşti intermediari. La scară industrială sunt utilizate doar tulpini de *Mycobacterium*. De regulă, intermediarii sunt produşi de microorganisme în diferite mixturi şi necesită etape suplimentare de purificare, iar o bioconversie 100% nu poate fi realizată momentan. Recent a fost creată tulpina recombinată *M. smegmatis* MS6039-59410, obţinută prin inserţia a două gene *17β-HSD*, capabilă să producă testosteron într-o singură etapă (Fernández-Cabezón şi colab. 2018).

Biosinteza *de novo* a progesteronului din diverse surse de carbon (galactoză, etanol) a fost realizată cu succes în tulpini recombinate de *Saccharomyces cerevisiae*, prin manipularea căii de biosinteză a sterolului endogen pentru a genera o moleculă asemănătoare colesterolului, ce serveşte ca precursor a unei căi heterologe multi-enzimatice care imită biosinteza steroizilor umani.

Bioconversia steroizilor bazată pe procese enzimatice *in vitro*, catalizată de proteine recombinate, nu a fost implementată industrial, din cauza costurilor mari ale acestor enzime. Se apreciază că metodele actuale de editare a genomului (CRISPR-Cas) vor permite designul versatil al micobacteriilor şi al altor microorganisme pentru a eficientiza biotehnologia sterolilor şi pentru a implementa căi de bioconversie competitive industrial.

Terapia hormonală în oncologie

Terapia hormonală constituie una dintre ramurile oncologiei medicale (farmacoterapiei anticancer) ce implică manipularea sistemului endocrin prin administrarea exogenă de hormoni specifici, în special hormoni steroizi sau medicamente care inhibă producția sau activitatea acestor hormoni (antagoniști hormonali). Deoarece hormonii steroizi sunt factori puternici ai exprimării genelor în anumite celule canceroase, modificarea nivelurilor sau activităţii anumitor hormoni poate

determina încetarea creșterii anumitor tipuri de tumori sau chiar apoptoza. Îndepărtarea chirurgicală a organelor endocrine, cum ar fi orhiectomia și ooforectomia, poate fi, de asemenea, utilizată ca formă de terapie hormonală. Terapia hormonală este utilizată împotriva mai multor tipuri de cancer: de sân, prostată, endometru și cortex suprarenal. Terapia hormonală poate fi utilizată și în tratamentul sindroamelor paraneoplazice sau pentru ameliorarea anumitor simptome asociate cancerului și chimioterapiei, cum ar fi anorexia. Stimularea hormonală a sistemului imunitar cu interferoni și citokine este utilizată pentru tratarea cancerelor specifice, inclusiv carcinom renal și melanom.

Terapia hormonală are multiple aplicaţii în oncologie, prin:

- Inhibarea sintezei hormonale cu analogi ai gonadotropinelor, ce au ca efect castrarea chimică – supresia completă a estrogenilor şi progesteronului de către ovare, respectiv a testosteronului de către testicule: goserelina (Zoladex) şi leuprorelina (Eligard, Lorelin);
- Antagonişti ai receptorilor hormonilor cu modulatori selectivi ai receptorilor pentru estrogeni precum tamoxifen, raloxifen sau antiandrogeni precum flutamid (Eulexin); chiar mai eficienţi sunt inhibitorii de aromatază precum letrozol, anastrozol, aminoglutetimida;
- Suplimentarea hormonală cu preparate farmaceutice ce conţin progestageni – acetat de megestrol (Megace), androgeni – fluoximestron (Halotestin), estrogeni – fosfat de poliestradiol (Estradurin) sau somatostatine – acetat de octreotid (Sandostatin).

Antihormonii

Terapia antihormon cu antagonişti ai gonadotropinelor blochează hormonii vizați sau efectele lor, în contrast cu terapia de substituție hormonală, care încurajează activitatea hormonală. Activitatea antihormonală se realizează de obicei prin antagonizarea funcției (cu un antagonist al hormonilor) și, uneori, prin prevenirea producerii acestora. Acest lucru se poate face atât medicamentos, cât şi cu radiații sau chiar chirurgie. Suprimarea anumitor hormoni poate fi benefică pentru pacienții cu afecţiuni precum acneea, alopecia şi diferite tipuri de cancer, deoarece anumiți hormoni promovează sau ajută la creșterea unei tumori, fapt valabil mai ales în cazul cancerelor legate de organele sexuale. Tratamentul antihormon este, adesea, specific pentru fiecare sex. De exemplu, terapia de deprivare de androgeni care utilizează antiandrogen este importantă în tratarea cancerului de prostată. Cancerul de sân, care apare atât la femei, cât și la bărbați, dar a cărui incidenţă a bolii este majoritară la femei, poate fi tratat și cu terapie de deprivare a estrogenului folosind antiestrogeni. Antiestrogenii nu sunt foarte eficienți în cazurile de cancer ovarian.

9.6.5. Hormonul stimulator al tiroidei

Structural, hormonul stimulator al tiroidei (TSH sau tirotropina) este clasificat ca membru al familiei gonadotropinelor, deși funcțional vizează glanda tiroidă. Este o glicoproteină heterodimerică de 118 aminoacizi, care prezintă o subunitate α comună gonadotropinelor și o subunitate β unică. TSH este sintetizat de un tip distinct de celule hipofizare. Sinteza și eliberarea sa sunt promovate de hormonul care eliberează tirotropina, un hormon hipotalamic. TSH își exercită efectele caracteristice prin legarea receptorilor specifici care se găsesc în primul rând, dar nu exclusiv, pe suprafața celulelor glandei tiroide. Efectele caracteristice ale TSH asupra funcției

tiroidiene includ promovarea absorbției de iod din sânge, sinteza hormonilor tiroidieni conținând iod (tiroxină și triiodotironină) și eliberarea acestor hormoni în sânge. Nivelurile plasmatice crescute de tiroxină (T4) și triiodotironină (T3) scad sinteza și eliberarea TSH printr-un mecanism de feedback negativ.

TSH este aprobat pentru utilizare medicală pentru diagnostic în detectarea cancerului tiroidian şi a resturilor de tiroidă la pacienții cu post-tiroidectomie. Cancerul tiroidian este relativ rar, prezentând o incidență mai mare la adulți, în special la femei. Tratamentul presupune îndepărtarea chirurgicală a glandei tiroide, urmată de terapia de supresie a hormonilor tiroidieni, care implică administrarea de T3 sau T4 la niveluri suficiente pentru a menține niveluri serice scăzute de TSH. Suprimarea TSH este necesară pentru a preveni stimularea mediată de TSH a celulelor rămase. Recidivarea cancerului tiroidian activ poate fi detectată prin administrarea de TSH împreună cu iod radioactiv. TSH promovează absorbția radioactivității, care poate fi apoi detectată prin tehnici adecvate de radioimagistică (Walsh 2007).

Un produs biofarmaceutic pe bază de TSH recombinat este disponibil comercial, sub denumirea de **tirotropină alfa** (Thyrogen, Sanofi Genzyme). Este produsă într-o linie celulară CHO transfectată cu plasmide care includ secvențele de ADN ce codifică subunitățile α- și β-ale TSH uman. Celulele sunt cultivate în bioreactoare, iar după recuperare și concentrare prin ultrafiltrare, TSH este purificat cromatografic și formulat la o concentrație de 0,9 mg/ml în tampon fosfat conținând manitol și clorură de sodiu ca excipienți. După filtrarea sterilă și transferul aseptic în flacoane de sticlă, produsul este liofilizat.

9.6.6. Parathormonul şi calcitonina

Hormonul paratiroidian (PTH) secretat de glandele paratiroide este o polipeptidă de 84 de aminoacizi ce funcționează ca un regulator principal al metabolismului fosfo-calcic. Stimulează formarea osoasă de către osteoblaste, care prezintă receptori de suprafață de înaltă afinitate pentru hormon. PTH crește, de asemenea, absorbția intestinală a calciului şi activează vitamina D la nivel renal.

O serie de produse pe bază de PTH recombinat sunt disponibile încă din 2002. **Teriparatida** (Forsteo, Eli Lilly) este o un fragment al proteinei umane, capabil să se lege de receptorul PTH nativ și să declanşeze aceleași efecte. Este produsă în *E. coli,* purificată și formulată într-o soluție sterilă, aprobată pentru tratamentul osteoporozei la femeile aflate în postmenopauză. Biosimilarii Terrosa (Gedeon Richter) şi Movinia (STADA Arzneimittel) au fost aprobaţi în UE în anul 2017, pentru aceeaşi indicaţie. Medicamentul Natpar (Shire-NPS Pharmaceuticals), destinat hipoparatiroidismului, ce conţine **parathormon uman recombinat** produs în *E. coli,* este similar cu Preotact (NPS Pharma) care a fost retras de pe piaţă.

Calcitonina umană sintetizată de celulele parafoliculare specializate din tiroidă este o polipeptidă cu un singur lanț de 32 de aminoacizi. Secvenţa de aminoacizi a calcitoninei provenite de la somon diferă de hormonul uman prin nouă reziduuri de aminoacizi. Cu toate acestea, are o potenţă de aproximativ 100 de ori mai puternică decât hormonul nativ uman. Potența mare se datorează unei afinități mai bune pentru receptor și unei rezistențe mai mari la degradare *in vivo*. Ca atare, **calcitonia de la somon recombinată** este utilizată clinic, iar o astfel de moleculă a obținut

aprobarea de comercializare (Fortical, Upsher-Smith Laboratories). Calcitonina recombinată este produsă într-o tulpină de *E. coli* modificată. Structural, calcitonina de somon este amidată terminal, caracteristică necesară pentru o activitate biologică completă. Deoarece *E. coli* nu poate efectua modificări post-translaționale, amidarea calcitoninei recombinate se efectuează *in vitro* folosindu-se o enzimă care este la rândul ei produsă prin inginerie genetică într-o linie celulară CHO. Produsul finit purificat şi amidat este formulat într-un tampon de acetat (Walsh 2007).

Peptida genei calcitoninei (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP) este o neuropeptidă de 37 de aminoacizi exprimată în ţesutul nervos, într-o cale alternativă exprimării calcitoninei în ţesutul tiroidian. CGRP modulează semnalizarea nociceptivă și este un vasodilatator care a fost asociat cu fiziopatologia migrenei. Spre deosebire de alte neuropeptide, s-a dovedit că valorile CGRP cresc semnificativ în timpul migrenei și revin la valori normale odată cu ameliorarea cefaleei. Lansat în anul 2018, **erenumab** (Aimovig, Amgen) este un anticorp monoclonal uman IgG2 complet, produs prin utilizarea tehnologiei ADN recombinat în celule CHO, indicat în terapia migrenei. Erenumab se leagă de receptorul CGRP, situat în situsuri care sunt relevante pentru fiziopatologia migrenei, de exemplu, ganglionul trigeminal. Erenumab concurează în mod potent și specific cu legarea CGRP și inhibă funcția acesteia la nivelul receptorului, neavând o activitate semnificativă împotriva altor receptori din familia calcitoninei. Este indicat pentru profilaxia migrenei la adulții care prezintă migrene de cel puțin 4 ori pe lună.

9.6.7. Peptidele natriuretice atriale

Peptidele natriuretice sunt hormoni vasodilatatori secretaţi de celulele musculare atriale ale inimii, implicate în reglarea homeostaziei apei, sodiului, potasiului și lipidelor. Stimulând natriureza, factorii natriuretici atriali acționează pentru a reduce cantitatea de apă și sodiu din plasmă, reducând astfel tensiunea arterială. Disponibilă din anul 2001, **nesiritida** (Natrecor, Johnson&Johnson / Scios) este o variantă recombinată a unui fragment al factorului natriuretic de tip B. Peptida de 32 de aminoacizi produsă în *E. coli* este indicată în insuficiență cardiacă congestivă descompensată. Totuşi, eficienţa medicamentului este controversată (Gong şi colab. 2016).

10. TERAPII GENETICE ŞI CELULARE

Pe lângă proteinele terapeutice, biofarmaceuticele includ şi medicamentele bazate pe acizi nucleici, ce au potenţialul de a revoluţiona practica medicală. Câteva tipuri de tehnologii genetice sunt în plină dezvoltare: terapia genică, vaccinurile ADN şi ARN, oligonucleotidele antisens, aptamerii, ARN interferent mic şi moleculele modificate de ARN. Puţine astfel de produse farmaceutice sunt aprobate în prezent, însă cercetările sunt intense pentru dezvoltarea acestor terapii inovative. Medicamentele pe bază de celule oferă, de asemenea, un potențial extraordinar. Un număr mic de astfel de produse au obținut recent aprobarea, dar este îmbucurător faptul că tot mai multe boli pediatrice dar şi cancere vor putea fi vindecate cu succes prin aplicarea clinică a acestor terapii avansate. Circa 20 de terapii cu celule modificate genetic (inclusiv CAR-T), şase biomolecule pe bază de ARN interferent şi aptameri şi patru medicamente pe bază de ARNi au lost lansate pe piaţă foarte recent.

10.1. Terapia genică

Terapia genică este definită ca procedura utilizată pentru tratarea sau îmbunătățirea stării de sănătate prin modificarea genetică a celulelor pacientului. Oferă o abordare unică pentru tratarea atât a bolilor ereditare, cât și a celor dobândite, prin livrarea în nucleu a materialului genetic terapeutic și a elementelor de reglare asociate. Scopul este de a corecta pierderea funcției cauzată de mutație sau de a exprima produsul genetic deficitar la nivel fiziologic. De mai bine de 30 de ani, sute de cercetători au susținut că modificările genetice ar oferi tratamente eficiente pentru multe boli ereditare, oferind beneficii clinice durabile și posibil curative cu un singur tratament (Mendell şi colab. 2021). Potențialul terapiilor genetice ca abordare curativă pentru anomaliile metabolice ereditare şi alte afecțiuni induse de prezența unei alele afectate a unei gene specifice este evident. Descifrarea bazei moleculare a diferitelor boli, precum cancere, boli infecțioase, genopatii hemoragice şi afecţiuni neurologice, are un rol esenţial pentru dezvoltarea terapiei genice.

Teoretic, principiul fundamental care stă la baza terapiei genice este destul de simplu, însă este mai dificil de realizat în practică. Abordările practice în terapia genică includ:

A. Terapia genică *in vitro* ce presupune prelevarea celulelor țintă de la pacient, urmată de incubarea lor cu vectorul transformat care conține acid nucleic. După ce vectorul livrează acidul nucleic în celulele umane, acestea sunt reintroduse în organism. Strategia este utilizată pentru celule stem, celule sangvine, epiteliale, musculare şi hepatice.

B. Terapia genică *in situ* implică injectarea directă a vectorului transformat imediat adiacent celulelor țintă ale corpului. Poate fi administrat şi prin aerosolizare, spre exemplu, pentru celulele epiteliului respirator în fibroza chistică.

C. Terapia genică *in vivo* implică administrarea eficientă şi sigură a vectorului conceput astfel încât să recunoască și să vizeze numai celulele țintă intenționate. O modalitate revoluţionară o

constituie tehnica CRISP-Cas, care permite editarea specifică a genelor şi corectarea unor defecte genetice.

Pionieratul tehnologiei ADN recombinat a fost marcat de utilizarea virusului simian vacuolant (SV40) ca vector de transducţie. Pentru aceste cercetări, Paul Berg a fost distins cu Premiul Nobel pentru Chimie în anul 1980, împreună cu Walter Gilbert și Frederick Sanger. Tehnologia a condus la dezvoltarea unor produse biofarmaceutice, şi multe altele sunt încă în cercetare. Abordarea este vastă, orientată înspre tratamentul bolilor cauzate de tulburări genetice recesive (fibroză chistică, hemofilie, distrofie musculară și anemie falciformă), boli genetice dobândite cum sunt unele tipuri de cancer, boli autoimune precum artrita reumatoidă şi anumite infecții virale, cum ar fi SIDA etc. Protocoalele aplicate în practică au ca obiectiv substituţia enzimatică (adenozin deaminaza, dezoxiribonucleaza, glucocerebrozidaza), substituţia proteinelor şi a peptidelor (alfa 1 antitripsina, receptorii lipoproteinelor, factorul IX al coagulării), inactivarea antigenelor virale, eliberarea de citokine, îmbunătăţirea funcţiei imune, îndepărtarea tumorilor, chemoprotecţie, marcarea celulelor stem etc.

10.1.1. Vectori utilizaţi în terapia genică

Principiul de bază constă în inserarea genei funcţionale într-un vector capabil să o livreze în condiții de siguranță în celulele pacientului, ţintind celule predeterminate. Pasul critic în realizarea terapiei genetice îl constituie alegerea vectorilor. Vectorul și sistemul de cedare optim depind de caracteristicile celulelor țintă, de durata de exprimare și dimensiunile materialului genetic care urmează să fie încorporat. Vectorii utilizați pentru terapia genică pot fi vectori virali (transducţie), vectorii non-virali (transfecţie) și vectori proiectați. Vectorii virali rămân în continuare atrăgători, deși recent au fost dezvoltate metode noi de manipulare a genelor (CRISPR-Cas) și metode de livrare mai eficiente pentru vectorii non-virali. Domeniul terapiei genice progresează extrem de rapid, cu mii de studii clinice efectuate. Dintre acestea, 64,6% se referă la terapia cancerului, 10,5% se concentrează pe boli monogenice, 7,4% pe boli infecțioase și 7,4% pe boli cardiovasculare. Aproape 70% din studii se bazează pe constructe genetice cu vectori virali (Beitelshees şi colab. 2017).

Vectorii virali

O gamă largă de virusuri sunt utilizate pentru proiectarea vectorilor virali (**Tabel 16**). Construcția vectorilor genetici presupune înlocuirea genelor virale endogene, necesare pentru replicarea virală normală, cu gena exogenă de interes (transgena). În urma îndepărtării genelor structurale virale, vectorul rezultat nu se poate reproduce. Dezvoltarea vectorilor virali în scopuri terapeutice implică propagarea inițială în linii celulare animale adecvate, recuperarea, concentrarea, purificarea și formularea produsului (Walsh 2007). Printr-o tehnică asemănătoare VLP, capside virale goale pot fi generate prin exprimarea unor proteine structurale în *E. coli*. O abordare nouă o constituie vectorii virali himerici. Aceştia încorporează proprietățile favorabile a doi sau mai mulți vectori, manipulând avantajele și dezavantajele fiecăruia, iar combinarea sistemelor vectoriale permite aplicații specifice ale terapiei genice.

Tabel 16. Vectori virali utilizaţi în terapia genică (după Lundstrom 2018; 2019).

Virus	Genom	Insert (kb)	Caracteristici
Retrovirusuri (MMSV, MSCV)	ARNmc	8	Transducţia celulelor capabile de diviziune Sistem de împachetare Exprimare pe termen lung Integrare aleatoare
Lentivirusuri (HIV-1, HIV-2, EIAV)	ARNmc	8	Multe tipuri de gazde (celule care nu se divid) Exprimare pe termen lung Integrare în cromosom Citotoxicitate scăzută
Adenovirusuri (Ad5)	ADNdc	<7,5	Multe tipuri de gazde Neintegrante în genom Exprimare tranzitorie Imunogenitate accentuată
Parvovirusuri (AAV2, 3, 5, 6, 8, 9)	ADNmc	<4	Multe tipuri de gazde Se integrează în cromosom Debut lent la exprimare Imunogenitate
Herpesvirusuri (HSV)	ADNdc	>30	Multe tipuri de gazde Infecţie latentă Exprimare pe termen lung Toxicitate scăzută Insert de dimensiuni mari
Poxvirusuri (VV)	ADNdc	>30	Multe tipuri de gazde Insert de dimensiuni mari Vectori competenţi de replicare
Alfavirusuri (SFV, SIN, VEE, M1)	ARNmc	8	Multe tipuri de gazde, inclusiv neuroni Auto-amplificatoare Exprimare tranzitorie Imunogenitate scăzută Lipsa unui sistem eficient de împachetare
Flavivirusuri (DV, KV, TBEV, WNV, YFV)	ARNmc	6	Multe tipuri de gazde Auto-amplificatoare Exprimare tranzitorie Sistem de împachetare
Rhabdovirusuri (virusul rabiei, VSV)	ARNmc	6	Multe tipuri de gazde Auto-amplificatoare Exprimare tranzitorie Imunogenitate scăzută
Paramixovirusuri (MV, NDV)	ARNmc	6	Vectori oncolitici Auto-amplificatoare Exprimare tranzitorie
Picornavirusuri (virusuri Coxsackie)	ARNmc	6	Vectori oncolitici

AAV – virusul adeno-asociat; Ad – adenovirus; dc – dublucatenar; DV – virusul Dengue; EIAV – virusul anemiei infecţioase ecvine; HIV – virusul imunodeficienţei umane; HSV – virusul *Herpes simplex*; KV – virusul Kunjin; M1 – virusul M1; mc – monocatenar; MMLV – virusul leucemiei murine Moloney; MMSV – virusul sarcomului murin Moloney; MSCV – virusul celulelor stem murine; MV – virusul rujeolic; NDV – virusul bolii Newcastle; SFV – virusul Semliki Forest; SIN – virusul Sindbis; TBEV – virusul encefalitei transmise de căpuşă; VEE – virusul encefalitei ecvine venezuelene; VSV – virusul stomatitei veziculare; VV – virusul vaccinia; YFV – virusul febrei galbene; WNV – virusul West Nile

Ingineria vectorilor virali cuprinde două strategii: modificarea suprafeței vectorului și modularea secvențelor de reglare din genomul vectorului. Proiectarea particulelor vectoriale la suprafaţa lor nu reduce capacitatea de împachetare şi diminuează pierderile particulelor vectoriale la celule nețintă (Buchholz şi colab. 2015). O componentă critică a vectorilor orientaţi către receptor o constituie ligandul de direcționare ce mediază afinitatea selectivă la receptorul țintă (Frank şi

Buchholz 2019). Sunt vizaţi anticorpi, factori de creştere sau hormoni dispuşi la suprafaţa unor vectori.

I. Vectorii retrovirali. Retrovirusurile sunt virusuri învelite, cu genomul format dintr-o moleculă de ARN monocatenar de aproximativ 5-8 kb. Deși retrovirusurile sunt încadrate în diferite subfamilii, există trei grupe de bază: oncoretrovirusuri, lentivirusuri și spumavirusuri. Oncoretrovirusurile pot provoca cancer, lentivirusurile pot cauza imunodeficiență severă, iar spumavirusurile sunt benigne. Multe retrovirusuri provoacă boli grave la om, alte mamifere și păsări: HIV-1 și HIV-2, virusul T-limfotropic uman (HTLV), virusul leucemiei murine etc.

După infectarea celulelor gazdă, ARN-ul viral este transcris cu ajutorul reverstranscriptazei virale în ADNc și în cele din urmă produce ADN dublucatenar. Acesta se integrează ulterior în genomul celulei gazdă ca ADN proviral, iar transcrierea genelor provirale pe baza resurselor celulei generează ARNm responsabil de sinteza proteinelor necesare virionilor. Aceştia evadează din celulă înglobând elemente membranare ce vor constitui peplosul virusurilor nou formate.

Genomul retroviral conţine cel puţin trei gene structurale: *gag* (codifică proteinele capsidei virale), *pol* (codifică reverstranscriptaza) și *env* (codifică proteinele învelişului viral). La ambele capete ale genomului viral se află secvenţe repetate terminale lungi (LTR), care conţin promotori puternici, secvenţe amplificatoare și secvențe necesare integrării în ADN-ul gazdei. De asemenea, imediat adiacentă secvenţei LTR la capătul 5´ se află secvența de împachetare a ARN-ului viral, responsabilă de asamblarea particulei virale. Lentivirusurile deţin în plus două gene reglatoare, *tat* (codifică un transactivator transcripţinal) și *rev* (codifică un reglator post-transcripţional). Vectorii retrovirali sunt modificaţi prin deleţia genelor ce codifică proteine structurale. În cazul lentivirusurilor, deleţia genei *tat* suprimă replicarea virală, iar genele responsabile de asamblarea vectorului sunt inserate în trei plasmide pentru a reduce riscul de recombinare. Pentru a genera virioni maturi care conţin acidul nucleic al vectorului, genele structurale sunt introduse în celule recombinate ce vor fi capabile să producă particule virale cu deficiență de replicare. Ca sisteme de împachetare (*packaging cell lines*) se utilizează adesea liniile celulare HEK293 transfectate cu plasmide de împachetare ce conţin genele codificatoare ale proteinelor capsidei şi reverstranscriptazei virale. Aceste sisteme de transfer genetic funcţionează pe principiul o singură dată, o singură lovitură (*one time, single-hit*). Mai recent, au fost operate modificări în acest sistem retroviral de bază: includerea unui fragment al genei *gag*, promotori tisulari specifici etc.

Capacitatea retrovirusurilor de a pătrunde efectiv în diferite tipuri de celule și de a-și integra materialul genetic în genomul celulei gazdă într-un mod stabil, pe termen lung, le-a făcut să fie vectori potențiali evidenți pentru terapia genică. Totuşi, vectorii retrovirali au şi unele dezavantaje: sunt labili în diferite condiţii, nu infectează toate celulele capabile de diviziune, iar gena transferată se inserează aleator în cromosomul celulei gazdă, ceea ce poate genera complicaţii (Walsh 2007). Vectorii lentivirali au capacitatea de a infecta atât celule care se divid cât şi celule incapabile de diviziune, au un risc mult mai scăzut de a activa oncogene, iar biofarmaceuticele de ultimă generaţie dispun de livrare şi siguranţă îmbunătăţite.

Retrovirusurile reprezintă abordarea clasică pentru aplicațiile de terapie genică, iar primul studiu de terapie genică umană a implicat implantul autolog de celule ale măduvei osoase transduse *ex vivo* cu vectori retrovirali. Mai recent au fost vizate celule dendritice, celule stem hematopoietice sau celule T modificate care exprimă un receptor de antigen himeric (CAR-T) (Lundstrom 2018). O

serie de produse biofarmaceutice (Strimvelis, Zynteglo, Zalmoxis, Yescarta, Kymriah şi Tecartus) au la bază transferul de celule transduse cu retrovirusuri şi sunt detaliate în subcapitolul Terapii pe bază de celule.

II. Vectorii adenovirali. Adenoviridele constituie o familie de virusuri cu potențial patogen la om şi alte diferite specii. Sunt virusuri nude, cu genom ADN dublucatenar de aproximativ 35 kb, mai complex decât cel al retrovirusurilor. De regulă o mică parte din genom este eliminat atunci când se construiește un vector bazat pe adenovirus. În urma infecției, ADN-ul adenoviral ajunge în nucleu, dar nu se integrează în genomul celulei gazdă. Avantajul major în ceea ce priveşte terapia genică îl reprezintă capacitatea lor de a infecta celulele care nu se divid și de a exprima produsul transgenei. Totuşi, durabilitatea lor este limitată şi tratamentul presupune administrări repetate (Walsh 2007).

Peste 50% din candidaţii la vaccinuri pe bază de vectori virali utilizează în prezent adenovirusuri: împotriva virusurilor Ebola, Zika, hepatitei C, HIV, SARS-CoV-2 şi malariei (vezi subcapitolul Vaccinuri cu vectori virali recombinaţi). Adenovirusurile oncolitice modificate genetic reprezintă o perspectivă în dezvoltarea terapiilor anticancer. În cercetări se află constructe de adenovirus modificat conjugat cu SYENFSA, un ligand ce ţinteşte celulele tumorale pancreatice. Vectorii himerici bazaţi pe Ad5/3 sau Ad11/Ad3p s-au dovedit eficienţi, demonstrând propagare selectivă şi uciderea celulelor tumorale (Lundstrom 2018). Molecule dezvoltate:

- **Ad-p53** (Gendicine, Shenzhen SiBiono GeneTech) este primul medicament bazat pe terapie genică, aprobat în anul 2003 în China. Conţine un adenovirus oncolitic care exprimă gena *p53*, codificatoare a unui factor supresor tumoral. Este recomandat în cancerul capului şi gâtului (Zhang şi colab. 2018).
- **Candidatul CG0070** (Cold Genesys) este un imunoterapic oncolitic cu replicare selectivă bazat pe un construct pe bază de adenovirus (Ad5) modificat, care conține un promotor selectiv pentru cancer și o transgenă GM-CSF. Acesta distruge celulele tumorale ale vezicii urinare în două moduri complementare: se reproduce în interiorul celulelor tumorale ce posedă gene *Rb* disfuncționale, provocând liza acestora; liza celulelor canceroase poate elibera antigene derivate din tumori, şi împreună cu GM-CSF stimulează un răspuns imun sistemic antitumoral. CG0070 este un agent promițător pentru o varietate de tipuri de tumori solide, singur sau în combinație cu inhibitori ai punctelor de control imunitar (Burke şi colab. 2012).

III. Parvovirusurile sunt sisteme atractive pentru ingineria unor vectori de terapie genică siguri, eficienți și specifici. **Virusurile adeno-asociate (AAV)** sunt virusuri ADN foarte mici, monocatenare, ce conţin doar două gene în genomul de aproximativ 4,8 kb. Nu au capacitatea de a se replica autonom, ci doar în prezența unui adenovirus co-infectant sau a altor virusuri. Deși se găsesc în populația umană, nu sunt asociate cu nicio boală cunoscută. Ca dezavantaj, sistemele vectoriale virale adeno-asociate suportă doar constructe relativ mici. Totuși, acestea oferă un mecanism de transfer al genelor în celule care nu se divid şi facilitează exprimarea pe termen lung a transgenei. Spre deosebire de adenovirusuri, acidul nucleic transferat de virusurile adeno-asociate se poate integra în genomul celulei receptoare (Walsh 2007). **Bocavirusurile** sunt parvovirusuri care pot cauza boli respiratorii, inclusiv la om, studiate ca vectori virali. O abordare nouă o constituie vectorii himerici, precum cei alcătuiţi dintr-un virus adeno-asociat recombinat şi un bocavirus, care permit inserarea unor transgene de dimensiuni mai mari (Fakhiri şi colab. 2019). Sunt disponibile:

• **Alipogene tiparvovec** (Glybera, UniQure) a primit, în anul 2012, prima autorizare pentru terapie genică în UE şi SUA. Medicamentul este indicat pentru deficitul de lipoprotein lipază (LPL), ce cauzează pancreatita severă. Conţine vectorul viral adeno-asociat serotip 1 (AAV1), care livrează o copie intactă a genei LPL în celulele musculare. Vectorul a fost produs într-o linie celulară de lepidoptere (Sf9 de la *Spodoptera frugiperda*). Gena LPL nu este inserată în cromosom, ci rămâne ca ADN liber în nucleu. Injecția este urmată de terapie imunosupresivă pentru a preveni reacțiile sistemului imunitar. Boala are o prevalenţă foarte mică la nivel global (1-2:1.000.000) iar tratamentul are un cost foarte ridicat. Autorizaţia nu a fost reînnoită de producător în anul 2017 din cauza cererii reduse.

• **Voretigene neparvovec-rzyl** (Luxturna, Spark Therapeutics) a fost aprobat în UE în anul 2017 ca medicament orfan indicat pentru distrofie retiniană (amauroza congenitală Leber). Este o tulburare ereditară (1:40.000 nou-născuţi) dată de mutaţia homozigotă a genei RPE65, care provoacă orbire progresivă. Medicamentul conţine virusul adeno-asociat (AAV2) viu, nereplicativ, în care a fost inserat ADNc al genei umane RPE65 cu o secvenţă Kozak modificată şi promotor hibrid (actină beta de pui şi potenţiator al citomegalovirusului). Virusul este crescut în celule HEK293 și purificat pentru administrare (Russell şi colab. 2017).

• Disponibilă din anul 2019, **onasemnogene abeparvovec** (Zolgensma, Novartis Gene Therapies) este prima terapie genică destinată atrofiei musculare spinale la copii. Tulburarea neuromusculară este cauzată de o mutație a genei *SMN1*, care duce la deficitul proteinei SMN, necesară pentru supraviețuirea neuronilor motori. Medicamentul orfan este bazat pe un vector AAV recombinat nereplicativ, care utilizează capsida AAV9 pentru a furniza o transgenă *SMN1* umană complet funcțională. Capsida AAV9 poate traversa bariera hematoencefalică și transduce neuronii motori. Gena *SMN1* a fost concepută pentru a funcţiona ca ADN episomal în nucleul celulelor transduse și poate fi exprimată stabil pentru o perioadă extinsă de timp. Exprimarea transgenei este asigurată de un promotor constitutiv (potenţiator al citomegalovirusului şi actină beta de pui), având ca rezultat producerea continuă și susținută a proteinei SMN.

IV. Herpersviridele precum **virusul *Herpes simplex*** (HSV) sunt virusuri cu ADN dublucatenar şi reprezintă un alt sistem vectorial de perspectivă. HSV este un virus neurotrofic ce poate fi deosebit de util în administrarea genelor către neuronii sistemului nervos central şi periferic. În urma infecției, virusul rămâne de obicei latent în neuronii care nu se divid, genomul său păstrându-se într-o formă neintegrantă. Este dificil să se genereze particule de *Herpes simplex* nereplicative, dar totuși viabile, fără ca virusul să-şi păstreze capacitatea de a deteriora celulele pe care le infectează. Totuşi, datorită efectului pe termen lung, vectorii HSV sunt propuşi pentru multe aplicații în diferite boli. Biofarmaceutice lansate:

• **Talimogene laherparepvec** (Imlygic, Amgen Europe) a fost lansat pe piaţă în UE în anul 2015 ca terapie împotriva melanomului. Este un construct cu vector HSV-1 oncolitic, modificat prin deleţia ambelor copii ale genei ICP34.5 (*infected cell protein*) şi inserţia genei GM-CSF uman. Ulterior, şi gena ICP47 a fost îndepărtată. În infecţia cu tulpina sălbatică, proteina ICP47 suprimă răspunsul imunitar, iar deleţia genei are ca scop activarea sistemului imunitar. Talimogene laherparepvec se replică în celulele canceroase, iar exprimarea GM-CSF în contextul oncolizei virale favorizează recrutarea și activarea celulelor prezentatoare de antigen, promovând inițierea unui răspuns imun care țintește tumorile. Vectorul viral rămâne susceptibil la tratamentele anti-

HSV-1, cum ar fi aciclovir, ceea ce oferă un control suplimentar de siguranță asupra replicării și răspândirii virale (Pol şi colab. 2016).

V. Poxvirusurile sunt de asemenea utilizate ca vectori de livrare, în special **virusul vaccinia** al cărui genom alcătuit din ADN dublucatenar de aproximativ 190 kb poate găzdui mai mult de 30 kb de ADN străin. Au fost proiectaţi vectori competenți pentru replicarea selectivă în tumori, întrucât aceştia nu deteriorează celulele normale. Vectorii virali ce utilizează virusul vaccinia s-au dovedit utili în tratamentul cancerului. Au fost create o serie de sisteme recombinate bazate pe virusul vaccinia şi virusul variolei aviare, în care au fost inserate gene stimulatoare ale imunităţii antitumorale (PANVAC împotriva cancerului pancreatic, PROSTVAC împotriva cancerului de prostată etc). În dezvoltare se află:

- Candidatul pentru vaccin **rilimogene galvacirepvec/rilimogene glafolivec** (Prostvac, Bavarian Nordic) constituie o imunoterapie bazată pe poxvirusuri recombinate care exprimă antigenul specific prostatei (PSA) ca antigen asociat tumorii, pentru a genera un răspuns al celulelor T împotriva cancerului de prostată. Prostvac este alcătuit dintr-un regim heterolog care utilizează doi vectori poxvirali diferiți: PROSTVAC-V, un virus vaccinia recombinat (rilimogen galvacirepvec) și PROSTVAC-F, un virus al variolei aviare recombinat (rilimogen glafolivec). Ambii vectori conțin transgene pentru PSA uman și trei molecule costimulatoare pentru celulele T denumite colectiv TRICOM (LFA-3, ICAM-1 și B7.1) (Gulley şi colab. 2019).
- **Pexastimogene devacirepvec** (Pexa-Vec sau JX594, SillaJen) este un compus candidat aflat în studii clinice, testat ca medicament anticancerigen împotriva carcinomului hepatic, renal etc. Constructul conţine un vector vaccinia tulpina Copenhaga modificat prin inserţia genei GM-CSF, a genei *LacZ* şi îndepărtarea genei timidin kinazei. Această deleţie permite replicarea doar în celule ce conţin un nivel ridicat al enzimei, cum este cazul celulelor tumorale cu mutaţii ale genelor *RAS* şi *p53*. Virusul lizează celulele canceroase infectate și, de asemenea, exprimă GM-CSF care poate ajuta la inițierea unui răspuns imun antitumoral (Moehler şi colab. 2019).

VI. Au fost construiţi şi ***vectori ce utilizează virusuri auto-amplificatoare cu ARN dublucatenar***, cum sunt reovirusurile. Deși reovirusurile sunt în majoritate nepatogene la om, acestea au servit ca modele experimentale foarte productive. S-a demonstrat că reovirusurile au proprietăți oncolitice, replicându-se selectiv în celulele canceroase activate de proteine RAS, ceea ce a încurajat dezvoltarea acestor terapii. Lansate:

- **Pelareorep** (Reolysin, Oncolytics Biotech) este un medicament ce deține statutul de medicament orfan pentru gliom, cancer ovarian, pancreatic, peritoneal și gastric (FDA) și pentru cancerul ovarian și pancreatic (EMA), din anul 2018. Conţine un reovirus nud tip T3D, propagat în culturi de celule HEK293S, purificat din lizatul celular prin cromatografie pe schimbători de ioni, permeaţie în gel şi filtrare pe membrane cu porozitate de 0,22 µm (Ungerechts şi colab. 2018).

VII. Şi alte ***virusuri auto-amplificatoare cu ARN monocatenar*** sunt utilizate ca vectori virali, în afară de retrovirusuri. Astfel sunt alfavirusurile (virusul Semliki Forest, virusul Sindbis, virusul encefalitei ecvine venezuelene și M1) și flavivirusurile (virusul West Nile, virusul Dengue şi virusul Kunjin), ce posedă un genom cu polaritate pozitivă. În schimb, rhabdovirusurile (virusul rabiei și virusul stomatitei veziculare) și virusul rujeolic au un genom ARN cu polaritate negativă. Polaritatea ARN monocatenar determină mecanismul replicativ. Majoritatea virusurilor ARN auto-amplificatoare pot integra fragmente de 6-8 kb și generează niveluri ridicate de exprimare genică

tranzitorie pe termen scurt. Paramixovirusul bolii Newcastle se reproduce în mod specific în celulele tumorale, fiind aplicat ca vector pentru terapia genică oncologică. Coxsackievirusurile aparținând familiei *Picornaviridae* sunt alte virusuri nude cu ARN monocatenar ce sunt utilizate ca vectori oncolitici (Lundstrom 2019).

Vectorii non-virali

Eficienţa transducţiei celulare este relativ ridicată atunci când se utilizează vectori virali, dar există şi dezavantaje asociate acestora, precum imunogenitatea și citotoxicitatea. Sistemele de livrare a genelor terapeutice bazate pe vectori non-virali prezintă avantajul că nu sunt imunogene şi nu se integrează în cromosomii gazdei. Astfel, transfecţia nu perturbă gene şi nu activează oncogene. Vectorii non-virali constau în ADN liber, particule sau molecule chimice ce pot transfera molecule mici de ADN (oligonucleotide), molecule mari de ADN (plasmide) sau molecule de ARN (ribozime, ARNm, ARN interferent mic) (**Tabel 17**). Vectorii non-virali au şi avantajul de a nu limita dimensiunea fragmentului de ADN transferat.

Tabel 17. Metode de livrare a vectorilor non-virali (după Ramamoorth şi Narvekar, 2015).

Metoda de livrare	Mecanism	Ţesut / organ ţintă	Avantaje	Dezavantaje
Livrare directă (ADN liber, plasmide)	Endocitoză	Muscular, cardiac, tegument, hepatic, tumori solide	Sigur Simplu	Eficienţă scăzută a transfecţiei
Tun de gene	Jet de înaltă presiune cu heliu	Ovar	Flexibil Citotoxicitate redusă Eficient	Penetrare redusă
Electroporare	Creşterea permeabilităţii membranei celulare	Tegument, muscular	Eficient Repetabil	Distrugere tisulară Acces limitat la organele interne
Ultrasonare, microbule	Creşterea permeabilităţii membranei celulare	Encefal, cornee, rinichi, muşchi, inimă	Sigur Flexibil	Eficienţă redusă
Nanoparticule magnetice	Pinocitoză şi endocitoză	In vitro	Flexibilitate Citotoxicitate redusă	Transfecţie tranzitorie
Molecule anorganice	Endocitoză	In vitro	Producţie simplă Stabilitate Funcţional	Eficienţă redusă

Livrarea materialului genetic la ţintele celulare poate fi directă, prin injectare, sau prin metode fizice ori chimice. Metodele fizice includ injectarea, tehnici balistice, electroporarea, sonoporarea, fotoporarea, hidroporarea, cuplarea cu particule magnetice etc. Metodele chimice includ particule anorganice (fosfat de calciu, silicaţi, aur) sau purtători policationici cum sunt liposomii (complexe lipoplex) şi polimerii (complexe poliplex). Sunt utilizate o varietate de materiale biodegradabile sintetice ori naturale: lipide cationice, emulsii nanolipidice, nanoparticule lipidice solide, peptide mici, vectori polimerici precum polilizina, polietilenimina, chitosanul, poliesteri PLA şi PLGA, dendrimeri, polimetacrilat etc.

Lipoplexele. Lipidele cationice sunt purtători sintetici ai materialului genetic şi constau în amestecuri de fosfolipide cationice pentru condensarea și protejarea acizilor nucleici. Lipidele cationice se pot agrega în sisteme apoase pentru a forma vezicule denumite liposomi, care la rândul lor interacţionează spontan cu ADN-ul. Sute de lipide cationice au fost dezvoltate pentru transferul genelor (fosfatidilcoline, fosfatidilserine, sfingomielina etc). Fosfolipidele cationice au o structură

comună, reprezentată de capul hidrofil încărcat pozitiv și coada hidrofobă cu o structură linker. Grupul încărcat pozitiv se leagă de grupul negativ fosfat din acizii nucleici și formează o structură compactată unic numită lipoplex. Eficiența transfecției depinde de forma geometrică generală, de numărul grupurilor încărcate, de natura ancorei lipidice și de legătura linkerului.

Datorită sarcinii pozitive, lipoplexele interacționează electrostatic cu glicoproteine și proteoglicani din membrana celulară, facilitând endocitoza acizilor nucleici. Lipidele încărcate pozitiv înconjoară materialul genetic şi îl protejează împotriva nucleazelor intracelulare și extracelulare. Cu toate acestea, problema rezidă în încărcarea de suprafață, ce reduce timpul de circulație al lipoplexelor în sânge, limitându-le utilitatea la celulele endoteliului vascular. Diferite moduri de livrare pot ţinti epiteliul respirator, hepatocitele sau celulele musculare. PEG este un polimer neutru utilizat ca ecran de suprafață pentru a limita sarcina și a prelungi timpul de înjumătățire. Deși au toxicitate redusă, lipoplexele devin citotoxice la un raport lipide:ADN mai mare de 3:1 (Ramamoort şi Narvekar 2015).

Poliplexele. Polimerii cationici, cum sunt moleculele de polilizină sau polietilemimină, formează cu ADN-ul un complex electrostatic denumit poliplex. Poliplexele sunt mai stabile decât lipoplexele şi au acelaşi rol, de a stabiliza şi a proteja gena terapeutică. Ţesuturile/organele ţintă sunt plămânii sau cavitatea bucală. Nu sunt imunogene, însă eficienţa lor este scăzută.

10.1.2. Tehnologia antisens: oligonucleotide antisens şi aptameri

Diferite stări de boală sunt asociate cu producția sau superproducția necorespunzătoare a produşilor de exprimare a unor gene. Spre exemplu: exprimarea oncogenelor, supraexprimarea citokinelor în timpul unor stări de boală, superproducția de angiotensinogen, transcrierea intracelulară și traducerea genelor virale în timpul replicării virale intracelulare. În toate aceste cazuri, consecințele medicale ale unei astfel de exprimări inadecvate ar putea fi prevenite sau ameliorate prin reglarea exprimării, abordare denumită tehnologie antisens.

Abordarea antisens se bazează pe generarea unor secvenţe de ADN sau ARN scurte (12-30 nucleotide), specifice, monocatenare. Acestea sunt oligonucleotide antisens capabile să se lege specific de ADN, sau mai frecvent de ARNm derivat din gene specifice. Legarea se face pe bază de complementaritate şi împiedică exprimarea produsului genetic prin blocarea procesului de transcriere sau de traducere. Sunt mai ales concepute pentru a lega microARN, ARN necodificator de aproximativ 22 nucleotide și pentru a crește exprimarea proteinelor în scop terapeutic. Ca potențiale medicamente, oligonucleotidele antisens prezintă o serie de caracteristici importante, printre care specificitatea. Analiza statistică arată că orice secvență de nucleotide de cel puţin 17 baze este puțin probabil să apară de mai multe ori în genomul celulei umane. Prin urmare, o oligonucleotidă proiectată să se lege la ARNm, este puțin probabil să formeze un duplex cu orice altă moleculă de ARNm neţintă.

Avantajele suplimentare ale abordării oligonucleotidice antisens includ toxicitatea scăzută şi posibilitatea de a sintetiza automat fragmente oligonucleotidice. Dezavantajele includ sensibilitatea la nucleaze, timpul de înjumătăţire foarte redus în ser, rata slabă de absorbție celulară şi inactivarea orală rapidă. S-au făcut unele progrese pentru a depăși aceste dificultăți și se preconizează un avans semnificativ al noilor generații de oligonuclotide, mult mai eficiente terapeutic. Oligonucleotidele

native prezintă o legătură fosfodiesterică 3´ – 5´, fiind sensibile la nucleazele prezente în mod natural în majoritatea fluidelor extracelulare și a compartimentelor intracelulare. Timpul de înjumătățire plasmatică al oligonucleotidelor din ser este de circa 15 minute, iar oligonucleotidele ARN sunt chiar mai puțin stabile decât oligonucleotidele ADN. Modificarea selectivă a legăturii fosfodiesterice native poate face produsul rezistent la degradarea nucleazelor. Cel mai frecvent, modificarea presupune înlocuirea unuia dintre atomii de oxigen liberi ai legăturii fosfodiesterice cu un atom de sulf. *S-oligos* au o rezistență crescută la nucleaze, rămânând solubile în apă. De asemenea, sunt ușor de sintetizat chimic și prezintă un timp de înjumătățire de câteva ore (Walsh 2007). Oligomerii morfolinici (*morpholino*) sunt secvențe specifice mici (aproximativ 25 de baze) ce conțin baze de ADN atașate unor inele de metilenmorfolină, legate prin grupări fosforodiamidate.

Aptamerii, sau anticorpii chimici, sunt oligonucleotide ADN sau ARN monocatenar, capabile să se lege de proteine prin recunoaşterea structurii terţiare sau cuaternare, şi nu pe bază de complementaritate a secvenţei. Avantajele acestora de a fi uşor sintetizaţi şi mai puţin imunogeni în comparaţie cu anticorpii monoclonali îi fac promiţători pentru dezvoltarea de terapii împotriva leucemiei limfoblastice, leucemiei mieloide, leucemiei limfocitare, limfomului Hodgkin, limfomului anaplazic cu celule mari, limfomului Burkitt, limfomului difuz cu celule B mari, mielomului multiplu, a bolii grefă-contra-gazdă, anemiei aplazice, anemiei falciforme etc.

Aptamerii au un mare potențial în analiza proteomică multiplex pentru screeningul cu randament ridicat al noilor biomarkeri de diagnostic, prognostic și receptivitate la tratament, pentru identificarea de noi ținte moleculare. În plus, datorită afinității lor mari și selectivității față de moleculele țintă, aptamerii pot fi utilizați eficient pentru detectarea celulelor tumorale prin citometrie în flux și pot fi utilizați pentru monitorizarea mai precisă a unor cancere și, de asemenea, pentru diagnosticarea bolilor hematologice maligne.

O serie de biofarmaceutice pe bază de oligonucleotide antisens şi aptameri au fost aprobate în UE şi SUA:

- **Fomivirsen** (Vitravene, Isis Pharmaceuticals / Novartis Ophtalmics Europe), a fost prima terapie antisens aprobată încă din 1998, destinată retinitei cauzate de citomegalovirus la pacienţii cu SIDA. Este un *S-oligo* de 21 de nucleotide, sintetizat chimic şi formulat în soluţie sterilă de bicarbonat de sodiu, ce împiedică replicarea citomegalovirusului. A fost ulterior retras datorită cererii reduse, în urma succesului înregistrat de managementul terapeutic al HIV/SIDA şi dezvoltării terapiilor antiretrovirale.
- **Pegaptanib** (Macugen, Eyetech / Pfizer, Pharma Swiss) (2004) este o oligonucleotidă conjugată cu PEG, indicat pentru tratamentul degenerescenţei maculare neovasculare. Este un aptamer al VEGF, ce se leagă în mod specific de izoforma 165 a VEGF, o proteină care joacă un rol critic în angiogeneză și permeabilitate.
- **Mipomersem** (Kinamro, Kastle Therapeutics) (2013) este o oligonucleotidă antisens indicată în hipercolesterolemie familială homozigotă. Se leagă de ARNm ce codifică apolipoproteina B-100 (ApoB-100), componenta principală a lipoproteinelor cu densitate joasă (LDL) și a lipoproteinelor cu densitate foarte joasă (VLDL). În consecință, ARNm este degradat de ribonucleaza H, iar ApoB-100 nu este exprimată.

- **Eteplirsen** (Exondys 51, Sarepta Therapeutics) (2016) este o oligonucleotidă antisens indicată în distrofia musculară Duchenne. Distrofia musculară Duchenne este o maladie recesivă X-linkată ce apre cu o incidenţă de 1:5.000 de nou-născuţi băieţi. Eteplirsen este un oligomer morfolinic care ţinteşte anumite mutaţii, declanșând excizia exonului 51 din pre-ARNm a transcriptului distrofinei. Omiterea exonului 51 modifică cadrul de citire din aval, având ca rezultat producerea de distrofină funcțională.
- **Nusinersen** (Spinraza, Biogen) este o oligonucleotidă antisens de 18 baze, indicată în atrofia musculară spinală, o tulburare neuronală asociată mutaţiei în gena *SMN1*. Este un medicament orfan aprobat în anul 2016.
- **Inotersen** (Tegsedi, Ionis USA) (2018) este o oligonucleotidă monocatenară de 20 de baze destinată deteriorării nervoase la pacienţii adulţi cu amiloidoză ereditară tip transtiretină. Maladia este o boală neurodegenerativă autozomală dominantă, endemică în două zone din Portugalia.

10.1.3. ARN interferent şi ribozime

Interferenţa ARN (iARN) este un proces celular natural prin care se realizează inactivarea anumitor gene selectate (*gene silencing*). Mecanismul iARN oferă protecţie celulară împotriva secvențelor de nucleotide străine (virusuri, transpozoni etc) şi deține un rol important în reglarea exprimării genelor. Exprimarea genelor este redusă sau chiar stopată prin introducerea unor molecule mici de ARN necodificator care inhibă traducerea secvenţei ARNm. Multe caracteristici sunt comune cu tehnologia antisens, dar există și câteva diferențe importante în mecanismul prin care se realizează acest efect. Moleculele de ARN care realizează iARN în mod natural includ:

A. ARN mic de interferenţă (ARNsi, *small interfering RNA*) – fragmente scurte de ARNdc (20-25 de pb) rezultate din clivarea unor molecule mari de ARNdc de origine exogenă;

B. MicroARN (ARNmi) – fragmente scurte de ARNmc (20-22 nucleotide) rezultate din procesarea ARN necodificator.

Inactivarea genelor poate fi uşor aplicată prin transfecţie şi joacă un rol important în biologia celulară și moleculară. În celulele mamiferelor, ARNdc induce de regulă sinteza de interferoni ce contribuie la apărarea antivirală. Acest răspuns la interferon determină stoparea generalizată a sintezei proteinelor. Ca urmare, molecule mari de ARNdc nu pot fi utilizate pentru inactivarea unei gene specifice, dar ARNsi se poate sustrage radarului răspunsului la interferon și poate inactiva specific o anumită genă.

Ambele căi ale iARN (ARNsi şi ARNmi) se bazează pe structuri celulare precum ribonucleaza DICER și complexul de inducţie a inactivării (RISC, *RNA-induced silencing complex*). Proteina DICER inițiază iARN prin procesarea ARNdc pentru a forma ARNsi sau ARNmi. Aceste fragmente se pot lega de secvențe complementare de ARNm în cadrul RISC, un complex efector multienzimatic. Helixul ARNsi dublucatenar se derulează prin activitatea helicazei, iar catena sens a ARNdc este eliminată. Catena antisens rămasă facilitează legarea specifică a RISC la ARNm, prin complementaritatea bazelor. ARNm este scindat de componenta catalitică, proteina Argonaute, care în cele din urmă împiedică traducerea.

O abordare alternativă bazată pe iARN o reprezintă inhibarea exprimării cu ajutorul ARN în ac de păr (ARNsh, *short hairpin RNA*), secvențe sintetice scurte de ARN ce pot fi exprimate prin

vectori virali sau non-virali. Produsul exprimat de ARNsh este procesat de ribonucleaza DICER și încorporat în complexul RISC pentru degradarea țintită a ARNm.

Indiferent dacă iARN este mediată de ARNsi, ARNmi sau ARNsh, trebuie stabilit obiectivul general al inactivării genei. De asemenea, trebuie să se ia în considerare țintele genetice și tipurile de celule utilizate, să se proiecteze secvența specifică adecvată, să se determine durata exprimării genice și să se selecteze cele mai eficiente mijloace de livrare a ARN interferent. Tehnologia iARN are un potențial clinic evident, iar țintele terapeutice inițiale includ infecțiile virale, bolile neurologice și oncologice. Sinteza ARN cu secvența de nucleotide dorită este simplă, însă există obstacole majore, printre care timpul mic de înjumătățire plasmatică a ARNsi (<1 minut), din cauza degradării de către nucleazele serice. În prezent, dezvoltarea produselor biofarmaceutice bazate pe iARN vizează îmbunătățirea profilului farmacocinetic prin optimizarea stabilitaţii ARNsi şi ARNmi, livrarea către țesutul țintă, intrarea în celulele țintă, evitarea răspunsului imun înnăscut și reducerea efectelor în afara țintei.

Câteva medicamente pe bază de ARNsi au fost recent lansate pe piaţă:

- **Patisiran** (Onpattro, Alnylam) (2018) este indicat pentru tratamentul amiloidozei ereditare mediate de transtiretină (TTR) la pacienții adulți cu polineuropatie. Este un ARNsi dublucatenar care țintește în mod specific o secvență conservată genetic din regiunea 3' a ARNm al TTR. Patisiranul este formulat sub formă de nanoparticule lipidice, pentru a furniza ARNsi în hepatocite, sursa primară a proteinei transportoare TTR din circulație. Prin procesul de iARN, patisiranul provoacă degradarea catalitică a ARNm al TTR la nivelul ficatului, ceea ce duce la scăderea valorilor serice ale proteinei (Akinc şi colab. 2019).
- **Givosiran** (Givlaari, Alnylam) (2019) indicat pentru tratamentul porfiriei hepatice acute (AHP) la adulţi şi adolescenţi cu vârsta de peste 12 ani, este un ARNsi dublucatenar care determină degradarea ARNm al sintazei 1 a acidului aminolevulinic (ALAS1) în hepatocite. Prin iARN rezultă o reducere a concentrațiilor plasmatice ale unor intermediari neurotoxici precum acidul aminolevulinic şi porfobilinogenul, factorii cauzali ai crizelor AHP. Givosiran folosește un nou sistem de livrare hepatică care conjugă trei molecule de GalNac (N-acetilgalactozamină) la ARNsi. GalNac se leagă de receptorul asialoglicoproteinei hepatice, favorizând internalizarea fragmentelor ARNsi conjugate cu GalNac în celulele hepatice (Brandao şi colab. 2020).
- **Inclisiran** (Leqvio, Novartis) (2020) indicat pentru tratamentul bolilor cardiovasculare aterosclerotice (ASCVD), echivalenților de risc ASCVD și hipercolesterolemiei familiale heterozigote (HeFH). Este un ARN mic de interferenţă care inhibă translația proteinei PCSK9. ARNsi este conjugat cu carbohidrați GalNac triantenari ce se leagă de receptorii asialoglicoproteici exprimați abundent în ficat, ceea ce conduce la absorbția inclisiranului în mod specific în hepatocite (Kosmas şi colab. 2018).
- **Lumasiran** (Alnylam Pharmaceuticals) (2020) indicat pentru hiperoxaluria primară de tip 1. Biomolecula de ARNsi reduce nivelul enzimei glicolat oxidază, vizând ARNm al genei HAO1 ce codifică hidroxiacid oxidaza, prin interferența ARN în hepatocite. Scăderea nivelului enzimei reduce cantitatea de glioxilat disponibil, substratul pentru producția de oxalat, având ca rezultat reducerea concentraţiilor de oxalat urinar și plasmatic, cauza principală a manifestărilor bolii.

Ribozimele sunt secvențe de ARN ce pot funcționa drept catalizatori ai clivajului ARNm la secvențe specifice, blocând astfel traducerea. Multe ribozime clivează ARNm țintă acolo unde

există o anumită secvență de nucleotide GUC. Statistic, este probabil ca acest triplet să apară cel puțin o dată în majoritatea moleculelor de ARNm. Ribozimele pot fi direcționate specific către ARNm prin introducerea de oligonucleotide scurte, complementare cu ARNm țintă. Un avantaj potențial al ribozimelor este că o singură moleculă ar putea distruge mii de copii ale ARNm țintă şi prin urmare, un astfel de medicament ar fi foarte puternic. Câteva ribozime sintetice au fost dezvoltate pentru indicaţii antivirale (HCV, HIV, IAV, IBV, SARS-CoV etc), însă aceste proiecte au rămas în stadiul preclinic.

10.1.4. ARN mesager

O categorie de terapii pe bază de ARN o constituie medicamentele cu ARNm supus unor modificări chimice pentru îmbunătăţirea stabilităţii. După introducerea în celule, ARNm este tradus în proteine și își exercită funcția. În prezent, astfel de produse biofarmaceutice sunt concepute ca vaccinuri profilactice (vezi subcapitolul Vaccinuri împotriva SARS-CoV-2) şi terapeutice. Vaccinul personalizat împotriva cancerului presupune identificarea mutațiilor specifice cancerului în genomul pacientului, selectarea posibilelor secvențe care pot fi utilizate pentru producerea de antigene și sinteza ARNm pe baza acestei predicții. ARNm este injectat în cele din urmă în regiunea tumorii, iar limfocitele T cu specificitate antigenică pot fi extinse pentru a elimina celulele tumorale. Marele potențial al acestei proceduri este că imunoterapia personalizată este posibilă într-un timp relativ scurt, comparativ cu alte terapii personalizate (Kim 2020).

10.1.5. Obţinerea genelor, plasmidelor şi oligonucleotidelor

Fragmentele genetice pot fi obţinute fie prin clonare, fie prin sinteză chimică. Abordarea generală utilizată pentru a produce ADN plasmidial în scopul terapiei genice presupune inserarea plasmidei de interes cu ajutorul unui vector într-o tulpină a microorganismului producător, cultivarea microorganismului sursă în bioreactoare, recuperarea şi disrupţia celulelor, îndepărtarea resturilor celulare, precipitarea şi purificarea plasmidelor, concentrarea şi formularea.

Spre deosebire de alte produsele biofarmaceutice (proteine recombinate, gene şi plasmide), oligonucleotidele antisens sunt fabricate prin sinteză chimică directă. Tehnologia sintetică a fost dezvoltată şi optimizată, oligonucleotidele fiind reactivi folosiți pe scară largă în biologia moleculară ca amorse, sonde și în scopul mutagenezei direcționate. Nucleotidele necesare sunt mai întâi legate de o grupare chimică de protecție. Fiecare nucleotidă protejată este apoi cuplată la capătul în creștere al lanțului nucleotidic, atașat la o fază solidă. După cuplare, gruparea protectoare este îndepărtată, iar când sinteza secvenţei este completă, legătura care ancorează substanța chimică în faza solidă este hidrolizată, eliberând oligonucleotida liberă. Fragmentele oligonucleotidice sunt purificate prin HPLC (Walsh 2007).

Aptamerii sunt produși *in vitro* printr-un proces denumit SELEX, în care oligonucleotidele scurte cu secvențe de capăt fixe din biblioteci mari aleatorii sunt amplificate prin PCR și incubate cu molecule țintă. Ulterior, secvențele nelegate sunt îndepărtate, iar aptamerii sunt eliberaţi din complexele aptamer-moleculă țintă și secvențele sunt amplificate prin PCR sau transcriere inversă. Etapele de incubare-legare-eliberare-amplificare sunt repetate în 8-12 runde. După fiecare rundă,

aptamerii cu afinitate crescută sunt selectați, amplificați, clonați și secvențiați. O variantă a procesului este cell-SELEX, care presupune selecţia aptamerilor prin incubare cu linii celulare care exprimă sau nu anumite proteine, pentru selecţia pozitivă sau negativă, după caz. O altă metodă este X-SELEX, în care sunt utilizate biblioteci de acizi nucleici xenobiotici, rezistenţi la atacul nucleazelor, pentru a creşte stabilitatea aptamerilor (Giudice şi colab. 2020).

10.1.6. Tehnologia CRISPR-Cas

Vectorii virali continuă să fie esențiali pentru terapia genetică actuală, însă abordările editării genetice s-au diversificat. O strategie mai atractivă decât introducerea genei terapeutice într-un locus nou și potențial problematic o reprezintă corectarea directă *in situ* a aberațiilor genetice existente. Această alternativă permite repararea mutației patologice, evitând în același timp riscul de oncogeneză inserțională. Descoperirea și utilizarea nucleazelor pentru editarea genelor programabile au făcut acest lucru posibil, începând cu dezvoltarea nucleazelor ZFN, TALEN și, mai recent, a sistemului CRISPR-Cas (vezi subcapitolul Enzime specifice ingineriei genetice şi biologiei moleculare). Tehnologia CRISPR oferă o alternativă relativ simplă și eficientă pentru editarea specifică a genelor, fără dezavantajele terapiei genetice tradiționale, precum oncogeneza inserțională și toxicitatea imunogenă. Reprezintă cea mai recentă descoperire inovativă, pentru care cercetătoarele Jennifer Doudna şi Emmanuelle Charpentier au primit Premiul Nobel pentru Chimie în anul 2020.

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) constituie o familie de secvențe de ADN bacterian ce conțin fragmente de ADN din virusuri care au atacat anterior bacteria. Aceste fragmente sunt folosite de bacterii pentru a detecta și a distruge ADN exogen similar, în timpul atacurilor ulterioare. Secvențele CRISPR joacă un rol cheie în sistemul bacterian de apărare, iar sistemul CRISPR-Cas poate imuniza bacteriile împotriva anumitor bacteriofagi.

Sistemele CRISPR constau dintr-o succesiune de spaţiatori (*spacers*) și secvențe repetate (*repeats*), iar genele *cas* adiacente codifică proteinele implicate în răspunsul imun și mecanismele reparatorii ale moleculei de ADN. Diverse gene *cas* au fost descoperite în diferite organisme, ceea ce face clasificarea lor foarte dificilă. În prezent sunt cunoscute 93 de gene *cas* grupate în aproximativ 45 de familii, pe baza similarităţii secvenţelor proteinelor codificate.

La procariote, mecanismul de apărare mediată de CRISPR-Cas se derulează în trei etape: adaptarea, exprimarea şi interferenţa. Adaptarea are loc atunci când bacteria este invadată pentru prima oară de molecule de ADN exogen. Exprimarea şi interferenţa sunt realizate de câte ori se repetă invazia.

I. În prima etapă, adaptarea, secvenţe scurte ale ADN-ului străin, complementare spaţiatorilor, denumite protospaţiatori (*protospacers*), sunt recunoscute datorită unor regiuni adiacente conservate cu o lungime de 2-5 pb (*protospacer-adjacent motif*, PAM). Recunoașterea protospaţiatorilor este urmată de generarea și integrarea unei noi secvențe de acizi nucleici identici cu protospaţiatorul în matricea CRISPR, ca un nou spaţiator. Urmează repararea sistemului CRISPR și duplicarea secvenţei repetate proximale. Este posibilă şi achiziția de spaţiatori de la molecule de ARN, când este prezentă o revers-transcriptază fuzionată în principal cu proteina Cas1.

II. În etapa a doua, exprimarea, spaţiatorul este transcris într-un precursor al ARN CRISPR (ARNpre-cr), care este ulterior procesat de un complex distinct de proteine Cas în ARNcr matur. Secvența exprimată a spaţiatorului furnizată de către ARNcr recunoaște și ghidează complexul pentru a lega ținta specifică a protospaţiatorului.

III. În a treia etapă, interferența, acidul nucleic străin este recunoscut și distrus de către ARNcr și proteinele Cas. Complexul ARNcr-Cas localizează protospaţiatorul corespunzător și declanșează degradarea țintei cu ajutorul nucleazelor Cas specifice. Dacă nu există complementaritate între spaţiatorul CRISPR și ADN-ul străin, atunci secvența ADN nu este neutralizată de transcriptul spaţiatorului (Butiuc-Keul şi colab. 2021).

Astfel a luat naştere tehnologia cunoscută sub numele de CRISPR-Cas, care permite modificarea în mod eficient și specific a genelor cu ajutorul unor endonucleazelor recombinate Cas. Dintre acestea, prima studiată a fost Cas9. Prin livrarea într-o celulă a nucleazei Cas9 complexată cu ARN ghid (ARNg) sintetic, genomul celulei poate fi tăiat într-un situs dorit, permițând îndepărtarea, inactivarea sau corecţia genelor existente, şi chiar inserţia unor noi gene *in vivo*. Apariția recentă a tehnologiilor CRISPR-Cas uşor accesibile permite oportunităţi aproape nelimitate de editare a genomului. În afară de potențialul său ca instrument terapeutic, sistemul declanșează în prezent o revoluție în descoperirea de noi medicamente.

Secvenţele CRISPR simplifică crearea de animale modificate genetic care imită boala sau indică ce se întâmplă atunci când o genă suferă mutaţii. De asemenea, permit alterări de exprimare, putând fi utilizate la nivelul liniei germinale sau orientate către celule non-germinale. În crearea de modele celulare ale bolilor umane, sistemul CRISPR poate fi aplicat celulelor stem pluripotente umane. Celule stem pluripotente modificate cu CRISPR pot fi ulterior cultivate în organoide umane care prezintă fenotipul specific bolii. În acelaşi timp, fenotipul bolii este absent în organoidele de control cu fond genetic identic, dar fãră modificările CRISPR (Scott 2018; Enzmann şi Wronski 2019).

Sistemele CRISPR-Cas3, CRISPR-Cas9 şi CRISPR-Cas13a pot fi utilizate pentru a viza factorii de virulență, genele care codifică rezistența la antibiotice și alte secvențe relevante din punct de vedere medical. Această tehnologie reprezintă astfel o nouă formă de terapie antimicrobiană și o strategie prin care se pot manipula populațiile bacteriene. Studiile recente au sugerat o corelație între interferența locusului CRISPR-Cas și achiziţia rezistenței la antibiotice. Acest sistem asigură protecția bacteriilor împotriva ADN străin invaziv, cum ar fi transpozonii, bacteriofagii și plasmidele, principalele căi de obținere a rezistenței la antibiotice și a factorilor de virulență în bacteriile patogene. O perspectivă interesantă a sistemelor CRISPR-Cas programate să discrimineze între agenți patogeni și bacterii comensale este cea de modificare a comunităților microbiene (spre exemplu a microbiomului uman).

Sistemele CRISPR-Cas9 au fost proiectate să combată infecţii virale cauzate în principal de către dezoxiribovirusuri (HBV, HPV, virusul Epstein-Barr etc), nefiind eficiente în lupta cu ribovirusurile, întrucât endonucleaza Cas9 nu poate interacţiona direct cu molecule de ARN. Cercetările sugerează faptul că CRISPR constituie o modalitate eficientă de limitare a replicării virusurilor HBV, HPV şi a mai multor virusuri herpetice. Sistemele CRISPR anti-herpes au aplicații promițătoare, cum ar fi îndepărtarea virusului Epstein-Barr din celulele tumorale, ajutând la eliminarea invadatorilor virali din organele de transplant sau prevenirea apariției unor erupții

cutanate și infecții oculare recurente prin blocarea reactivării virusului *Herpes simplex* (van Diemen şi colab. 2016). Foarte recent au fost concepute sisteme CRISPR cu proteine Cas13a sau Cas13d, care ţintesc ARN, precum şi molecule de ARNg capabile să inactiveze coronavirusuri, fără a afecta transcriptomul uman (Abbot şi colab. 2020; Nguyen şi colab. 2020). O altă aplicaţie promiţătoare în contextul pandemiei COVID-19 o reprezintă dezvoltarea metodelor de diagnostic pentru monitorizarea îmbolnăvirilor. Aceste instrumente se bazează pe metoda SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) dezvoltată de Kellner și colab. în anul 2019. Metoda exploatează capacitatea proteinelor Cas12 și Cas13 de a tăia nespecific molecula de ARN în apropierea lor, dacă ARNcr își găsește ținta. Hibridizarea sondelor oligonucleotidice marcate fluorescent conduce la o emisie de semnal fluorescent, atunci când acidul nucleic țintă este prezent . Mai multe tipuri de ARNcr au fost concepute pentru a viza secvențe specifice în SARS-CoV-2 (Ding şi colab. 2020; Metsky şi colab. 2020; Curti şi colab. 2021) şi în alte virusuri umane (Ackerman şi colab. 2020; Butiuc-Keul şi colab. 2021).

Editarea genetică cu ajutorul CRISPR-Cas vizează unele dintre genele afectate de mutaţii asociate bolilor umane, inclusiv cele implicate în diferențierea musculară, sinteza hemoglobinei fetale, cancer, inflamație etc. Principalul obstacol în implementarea terapeutică bazată pe CRISPR-Cas9 îl constituie dezvoltarea unor nanovectori de livrare care să ghideze sistemul către anumite mutaţii genetice într-un mod specific. Sunt utilizaţi în acest sens vectorii virali adeno-asociaţi, metodele de electroporare, nucleofecție, microinjecție ori nanoparticulele. Vectorii virali adeno-asociaţi rămân un vehicul cheie de livrare pentru terapia genică CRISPR și continuă să fie utilizaţi pe scară largă pentru eficiența lor ridicată de livrare. Setul CRISPR poate fi ambalat ca ADN plasmidial care codifică inclusiv Cas9 și ARNg, sau poate fi livrat ca ARNm al Cas9 și ARNg. Metodele de electroporare sau microinjectare evită riscurile asociate vectorului viral, dar sunt dificile din punct de vedere tehnic și sunt potrivite doar pentru livrarea *ex vivo* (Cai şi colab. 2016).

Odată selectată modalitatea de livrare, modificările CRISPR-Cas9 pot fi facilitate fie *ex vivo*, dacă celulele sunt modificate genetic în afara pacientului și reintroduse înapoi, fie *in vivo*, cu livrarea directă a componentelor CRISPR la pacientul al cărui genom este editat. Avantajele pentru livrarea *ex vivo* includ o siguranță mai mare, deoarece pacienții nu sunt expuși instrumentului de modificare a genei, fezabilitate tehnică și un control mai strict al calității celulelor editate. Cu toate acestea, provocările acestei metode includ supraviețuirea și reținerea funcției *in vivo* a celulelor în afara pacientului după manipulare genetică și cultură extinsă *in vitro*. De asemenea, este necesară o cantitate adecvată de celule pentru o reîncărcare eficientă. Aceste condiții limitează metoda la anumite tipuri de celule care pot supraviețui şi se multiplică în culturi, cum ar fi celulele stem, celulele progenitoare hematopoietice și limfocitele T.

În timp ce terapia genică *ex vivo* oferă beneficii terapeutice pentru tulburările hematologice și imunoterapia cancerului, editarea genetică prin această metodă nu este adecvată pentru multe tipuri de țesuturi. Manipularea *in vivo* este astfel necesară pentru a extinde utilitatea CRISPR în tratarea unei game mai largi de boli genetice, cum ar fi distrofia musculară Duchenne și tirozinemia ereditară (Li şi colab. 2020). Componentele CRISPR pot fi administrate *in vivo* sistemic prin injecții intravenoase sau pot fi injectate local în țesuturile ţintă. Odată cu livrarea sistemică, componentele CRISPR și vehiculul său sunt introduse în sistemul circulator, unde exprimarea setului de instrumente de editare genică poate fi controlată pentru a viza organe specifice, prin intermediul promotorilor specifici țesutului. Cu toate acestea, provocările livrării *in vivo* includ degradarea de

către proteaze sau nucleaze circulante, opsonizarea de către opsonine sau eliminarea de către sistemul fagocitar mononuclear. Mai mult, încărcătura trebuie să ajungă la țesutul țintă dar să ocolească endoteliul vascular, acestea fiind adesea strâns legate prin joncțiuni celulare ce împiedică accesibilitatea vehiculelor de livrare cu diamterul mai mare de 1 nm. În plus, odată ce încărcătura a atins celulele țintă, aceasta trebuie internalizată, în general prin endocitoză, ceea ce o poate supune degradării de către enzimele lizosomale. În plus, localizarea sistemului de editare în apropierea punctului de injecție poate duce la o distribuție neuniformă a repertoriului celular editat în țesut, ceea ce poate induce rezultate terapeutice suboptime. În timp ce progresele continuă să rafineze tehnicile de livrare, sistemele actuale au permis utilizarea terapiei genice CRISPR în clinică (Uddin şi colab. 2020). Tehnologia CRISPR este utilizată şi pentru a dezvolta aplicații în ingineria țesuturilor și în medicina regenerativă. Au fost create vase de sânge utilizând celule endoteliale care nu exprimă proteinele MHC clasa I şi II. Acestea nu activează celulele T citotoxice şi astfel se previne respingerea transplantului (Merola şi colab. 2019).

Un avantaj major este faptul că secvenţele CRISPR permit ajustarea concomitentă a mai multor gene, ținând seama de faptul că majoritatea bolilor umane nu sunt determinate monogenic. Tumorile, de exemplu, sunt foarte eterogene, având de obicei multe tipuri de mutații, precum și diferenţe în cadrul aceleiaşi tumori. Începând cu anul 2016, sistemul CRISPR a fost studiat pe modele animale și pe linii de celule canceroase, pentru a afla dacă poate fi folosit pentru a repara sau a contracara genele mutante care provoacă cancer. Primul studiu clinic implicând tehnologia CRISP-Cas9 a fost aprobat de FDA în anul 2016, înrolând 22 de pacienţi. Terapia a constat în editarea genei PD-1 în limfocitele T recoltate de la pacienţi cu cancer pulmonar şi administrarea celulelor modificate înapoi la aceeași persoană. În anul 2020 rezultatele au fost publicate, concluzionându-se că aplicarea clinică a celulelor T editate cu CRISPR-Cas9 este în general sigură și fezabilă. Studiile viitoare ar trebui să utilizeze abordări superioare de editare genetică pentru a îmbunătăți eficacitatea terapeutică (Lu şi colab. 2020). În prezent, 43 de studii clinice în curs de derulare sunt înregistrate în platforma www.clinicaltrials.gov.

10.2. Terapii pe bază de celule şi ţesuturi

Medicina regenerativă se referă la tratamentele prin care se pot înlocui părţi ale corpului adult. Câteva strategii prezintă potenţial în acest domeniu:
1. utilizarea celulelor stem;
2. utilizarea unor celule proiectate;
3. transplantarea organelor/ţesuturilor obţinute *in vitro*;
4. inducerea regenerării cu ajutorul unor substanţe specifice.

Progresele legate de identificarea, izolarea și manipularea celulelor stem au condus la o atenţie enormă acordată atât din partea comunității științifice, cât și din partea publicului. Celulele stem dispun de un mare potențial medical, iar aplicarea lor în tratamentul afecțiunilor medicale încă necesită cercetări. În schimb, celulele complet diferenţiate sau grupările de celule (organe și țesuturi) se află deja în uz medical de rutină. Astfel de produse includ celule sau țesuturi utilizate în scopul transplantului, precum și câteva produse biofarmaceutice pe bază de celule proiectate. Inovaţia radicală adusă de terapiile avansate pe bază de celule proiectate a necesitat perioade de

dezvoltare de 20-30 de ani, de la introducerea conceptului până la lansarea pe piaţă. Momentan, dezavantajele majore ce conduc la un nivel redus de comercializare a medicamentelor pe bază de celule sunt cele date de complexitatea tehnologiilor, dificultățile legate de procesele de fabricație, barierele de reglementare şi factorii economici. Utilizarea clinică a celulelor stem încă întâmpină multe provocări, precum problema etică a utilizării embrionilor umani, respingerea după transplant și formarea tumorilor.

10.2.1. Transplantul

Transplantul presupune transferul de celule vii, țesuturi sau organe de la un donator la un receptor. În unele cazuri, cum este cel mai frecvent pentru grefele de piele, donatorul și receptorul sunt de fapt același individ, iar transplantul este autolog. Când donatorul și destinatarul sunt indivizi diferiți, transplantul este alogen. Formele obișnuite de transplant includ transfuziile de sânge integral, transplantul de măduvă osoasă, grefele de piele și transplantul unei game largi de organe (rinichi, ficat, pancreas, plămâni, inimă etc). Îmbunătățirea tehnicilor de transplant chirurgical, împreună cu disponibilitatea medicamentelor imunosupresoare eficiente, asigură rate de succes de 75-95% pentru majoritatea transplanturilor de organe. Fragmentele de ţesut şi organele destinate transplantului sunt rareori considerate produse farmaceutice. Materialul pentru transplant este de obicei recoltat direct de către medici prin intermediul unor tehnici chirurgicale sau a altor tehnici adecvate, urmate de transplantare directă, fără prelucrare semnificativă *in vitro*.

Cea mai comună formă de transplant o constituie transfuzia de sânge. Principala indicaţie a transfuziilor de sânge o reprezintă ameliorarea transportului de oxigen la nivel tisular, grav afectat în anemii severe de diverse etiologii, stări de şoc, diateze hemoragice, circulaţie extracorporeală, extrasanguinotransfuzie, leucopenii severe şi stări de imunodeficienţă. Sângele integral proaspăt este recoltat în unităţi de 450 ml iar numărul de unităţi administrate depinde de starea de sănătate și vârsta beneficiarului, împreună cu indicația terapeutică. Administrarea de sânge poate fi efectuată, de asemenea, pentru a furniza unui destinatar un anumit constituent sangvin (de exemplu un factor de coagulare, imunoglobulină, trombocite sau eritrocite).

Administrarea de sânge sau produse din sânge prezintă riscul transmiterii accidentale a agenților infecțioși. Prevenirea riscului infecţios se bazează pe examinarea atentă a donatorilor, inactivarea agenților patogeni în timpul etapelor de procesare şi screeningul atent al tuturor produselor finite. Identitatea fiecărui donator de sânge este înregistrată, iar pungile de sânge sunt etichetate, trasabilitatea donatorilor şi donațiilor individuale de sânge fiind esențială.

Există câteva criterii de admisibilitate la donarea de sânge:
- Vârsta cuprinsă între 18-60 ani;
- Greutate peste 50 kg;
- Tensiune arterială sistolică între 100-180 mmHg;
- Puls regulat, 60-100 bătăi/minut;
- Să nu fi suferit intervenţii chirurgicale în ultimele 6 luni;
- Pentru femei: să nu fie însărcinate, în perioada de lăuzie, în perioada ciclului menstrual;
- Să nu fi consumat grăsimi sau băuturi alcoolice cu cel puţin 48 de ore înaintea donării;

- Să nu fie sub tratament pentru diferite afecţiuni: hipertensiune, boli cardiovasculare, renale, hepatice, endocrine sau boli psihice;
- Să nu fi avut antecedente hepatice, TBC, malarie, sifilis, bruceloză, epilepsie și alte boli neurologice, boli psihice, ulcer, diabet zaharat, boli de inimă, boli de piele (psoriazis, vitiligo), miopie (peste -6 dioptrii), cancer.

Suplimentar, există câteva criterii de excludere permanentă: afecţiuni cardiovasculare (inclusiv hipertensiune arterială cronică în tratament, angină pectorală), traumatisme craniene cu sechele, etilism cronic, schizofrenie, hepatită cronică, ciroză hepatică, pancreatită, hiperlipidemie, astm bronşic, alergie severă, boli endocrine, lupus eritematos diseminat şi alte colagenoze. Persoanele pensionate medical, indiferent de diagnosticul de pensionare, sunt excluse de la donare. Criteriile de excludere temporară includ afecţiuni şi situaţii recente: boli infecţioase, anemie, examinare endoscopică, transfuzii, intervenţii chirurgicale, tatuaje, contact apropiat cu persoane cu hepatită sau HIV, vaccinări, tratamente dentare, consum de alcool în ultimele 48 de ore, consum de medicamente. Criterii suplimentare de excludere ce vizează donatorii de componente sanguine prin afereză constituie: trombocite $<200.000/mm^3$ de sânge, pat vascular necorespunzător, hipocalcemie, tratament cu antiagregante plachetare, corticosteroizi, anticoagulante în ultimele 7 zile.

Etapele recoltării şi prelucrării sângelui:

1. Completarea formularului de autoexcludere;
2. Controlul biologic predonare: determinarea grupei sanguine şi a Rh-ului, hemoglobinei şi glicemiei;
3. Consultaţia medicală care evaluează chestionarul de autoexcludere, rezultatele controlului biologic predonare şi include examenul clinic propriu-zis (tensiune arterială, puls, greutate, examen obiectiv);
4. Prelevarea aseptică a sângelui;
5. Adăugarea unui anticoagulant adecvat: heparină, citrat-fosfat-dextroză sau adenină-dextroză-sorbitol-clorură de sodiu-fosfat monosodic-manitol (ADSOL);
6. Testarea screening pentru unele boli infecţioase cu transmitere prin sânge (hepatite, sifilis, infecţie HIV);
7. După caz, centrifugarea fracţionată pentru separarea plasmei, a masei eritrocitare, leucocitare şi trombocitare, depozitarea sângelui integral sau a componentelor sangvine:

- Sângele integral stocat la temperatura de 4ºC cu o durată de valabilitate variabilă în funcție de anticoagulantul adăugat: 48 de ore după colectare dacă se folosește heparină, până la 35 de zile cu citrat-fosfat-dextroză sau 45 de zile conservat cu ADSOL;
- Masa trombocitară se prepară prin centrifugarea diferenţiată a sângelui proaspăt recoltat pe anticoagulant la 4ºC, utilizată în primele 6 ore de la recoltare;
- Concentratul leucocitar se prepară şi utilizează în primele 12 ore de la recoltare;
- Masa eritrocitară poate fi stocată până la un an la -80ºC în asociere cu glicerol;
- Plasma sangvină se prepară prin centrifugare sau sedimentare spontană din sângele recoltat pe anticoagulant în maxim 48 de ore şi se utilizează sub formă de: plasmă integrală proaspătă (4-8ºC, 6 ore); plasmă conservată prin congelare (-20ºC, 3 luni); plasmă conservată uscată prin liofilizare sau evaporare (10 ani); plasmă antihemofilică liofilizată preparată prin centrifugare, congelare şi liofilizare.

Materialul transfuzabil este reprezentat de sânge integral proaspăt sau conservat şi derivatele acestuia (plasmă, masă eritrocitară, leucocitară, trombocitară, fracţiuni plasmatice etc). Plasma defibrinată, fibrinogenul, albumina umană, crioprecipitatele factorilor coagulării sau imunoglobulinele specifice constituie derivatele din plasmă ce se administrează în diverse deficienţe şi afecţiuni. Sângele integral proaspăt administrat în primele 24 de ore are utilitate limitată, şi la fel masa trombocitară. În funcţie de tipul concentratului sanguin şi procedura de stocare, materialul transfuzabil se decongelează sau se resuspendă în apă ultrapură sterilă şi apirogenă. Se încălzeşte la 37°C imediat înainte de transfuzie şi se administrează intravenos în perfuzie lentă, exceptând hemoragiile masive când se impune accelerarea ritmului transfuziei.

Organele transplantate cu succes sunt inima, rinichii, ficatul, plămânii, pancreasul, intestinul, timusul şi uterul. Țesuturile includ oase şi tendoane (grefe musculo-scheletice), cornee, piele, valve cardiace, nervi și vene. La nivel mondial, rinichii sunt organele cel mai frecvent transplantate, urmate de ficat și apoi de inimă. Cornea și grefele musculo-scheletice sunt cele mai frecvent țesuturi transplantate. Donatorii de organe pot fi persoane vii, aflate în moarte cerebrală sau moarte cardiacă. Prelevarea ţesuturilor de la donatori se realizează de regulă în termen de 24 de ore după încetarea bătăilor inimii. Spre deosebire de organe, majoritatea țesuturilor, cu excepția corneei, pot fi conservate și depozitate timp de până la cinci ani. Transplantul ridică o serie de probleme bioetice, inclusiv definiția morții, când și cum ar trebui acordat consimțământul pentru transplantul unui organ și plata pentru organele de transplant. Există documetări istorice despre realizarea unor transplanturi, însă prima operaţie medicală reuşită, de la un donator viu, a constat într-un transplant de rinichi, în anul 1954.

Dezvoltarea biologiei sintetice ca inginerie rațională a căilor și materialelor biologice a adus beneficii în domeniul transplantului, prin două domenii de aplicare: generarea de ţesuturi şi organe din celule și matrice compozite și modificarea genomului pentru îndeplinirea funcției în organismul gazdei. Tehnicile actuale au permis trecerea de la culturile bidimensionale de celule la cele tridimensionale şi dezvoltarea platformelor organ-într-un-chip (*organ-on-a-chip*), revoluţionând major domeniul testării produselor farmaceutice în cercetarea preclinică. Organoide au fost produse *in vitro*, dar, cu toate acestea, generarea unor organe funcţionale este momentan impracticabilă, deoarece organogeneza rămâne dificilă în condiţii artificiale.

10.2.2. Celulele stem

Cu toate că celulele stem au fost descoperite în anii 1960, primul transplant de măduvă roşie osoasă a fost realizat în anul 1939, iar primul transplant alogen în 1957. Cercetările au fost intense în perioada de după Al Doilea Război Mondial, impuse de creşterea cazurilor de cancer ca urmare a expunerii la radiaţii ionizante. Transplantul de celule stem hematopoietice presupune transplantul acestor celule multipotente, de obicei derivate din măduva osoasă, sânge periferic sau sânge din cordonul ombilical. Poate fi autolog, alogen sau simgen (de la un geamăn identic). Este cel mai adesea efectuat la pacienții cu anumite tipuri de cancer precum mielom multiplu sau leucemie, dar şi boli autoimune, displazii scheletice ereditare, în special osteopetroza infantilă malignă şi mucopolizaharidoza. Infecțiile și boala grefă contra gazdă sunt complicații majore ale transplantului alogen.

Celulele stem se regăsesc în orice organism multicelular, fiind caracterizate prin abilitatea de a se înmulţi continuu prin mitoză şi de a se diferenţia apoi într-o gamă largă de celule specializate. După origine, există câteva mari categorii de celule stem:

- Celule stem embrionare, izolate din blastocişti;
- Celule stem din cordonul ombilical sau din placentă;
- Celule stem adulte, izolate din ţesuturi somatice;
- Celule stem pluripotente induse, generate din celule somatice;
- Celule stem canceroase, responsabile de formarea tumorilor şi recidiva acestora.

După potențialul de diferențiere, celulele stem pot fi:

a) totipotente (omnipotente) - se pot diferenția în tipuri de celule embrionare și extraembrionare: zigotul şi celulele rezultate în urma primelor câteva diviziuni ale acestuia;

b) pluripotente - sunt descendenții celulelor totipotente, se pot diferenția în aproape toate tipurile de celule, adică celule derivate din oricare dintre cele trei straturi germinale;

c) multipotente - se pot diferenția într-un număr de tipuri de celule, dar numai cele ale unei familii de celule strâns înrudite;

d) oligopotente - se pot diferenția în doar câteva tipuri de celule, cum ar fi celulele stem limfoide sau mieloide;

e) unipotente - pot produce un singur tip de celule, dar au proprietatea auto-reînnoirii, care le distinge de celulele non-stem.

Celulele stem sunt utile în medicină în trei direcţii generale: terapii bazate pe celule, descoperirea medicamentelor și cercetare fundamentală. Avantajele conferite de celulele stem embrionare, precum totipotenţialitatea, capacitatea nelimitată de diviziune şi plasticitatea le fac ideale pentru aplicaţii în medicina regenerativă. Utilizarea acestora rămâne controversată, deşi tehnicile de extragere a celulelor stem embrionare permit prelevarea acestora fără distrugerea blastociştilor. Sursele cele mai utilizate de celule stem rămân cordonul ombilical, placenta, măduva roşie osoasă şi ţesutul adipos. Cele mai populare în terapiile cu celule sunt celulele stem hematopoietice şi celulele stem mezenchimale. Tratamentele potenţiale cu celule stem includ o gamă largă de afecţiuni: cancer, leziuni ale sistemului nervos, afecţiuni cardiace, hematopoietice, oculare, ortopedice, calviţie etc.

Recoltarea de celule stem la naştere

Este o procedură simplă, care durează câteva minute, realizându-se prin metode standardizate, în condiţii riguroase de asepsie. Contraindicaţii absolute ale recoltării constituie infecţia maternă cu HIV, HTLV, sifilis activ, infecţie activă cu HBV, HCV sau CMV. Contraindicaţii relative reprezintă starea de purtător sau infecţie inactivă cu HBV, HCV, rubeolă şi toxoplasmoză contractate în cursul sarcinii. Recoltarea se realizeză din sânge şi ţesut de cordon ombilical, sânge şi ţesut din placentă.

Cordonul ombilical reprezintă o sursă importantă de celule stem mezenchimale, capabile să genereze celule cartilaginoase, osoase, musculare, interstiţiale, grăsoase, tegumentare, nervoase etc. Cordonul ombilical reprezintă atât sursa celor mai tinere celule stem mezenchimale, cât şi una dintre cele mai bogate surse, comparativ cu măduva osoasă, ţesutul adipos sau structurile dentare.

Prezervarea acestor celule se practică sub formă criogenată, pentru a-şi păsta toate calităţile iniţiale, fără a se maturiza şi fără a fi afectate de factori de mediu, boli sau unele tratamente.

Grefa de sânge placentar conţine un număr suficient de celule nucleate corespunzător unui transplant, cu rezultate bune în cazul copiilor cu boli de sânge maligne, dar şi non-maligne sau congenitale. Studiile efectuate şi noile posibilităţi de utilizare ale grefelor de sânge placentar (asocierea grefelor de celule stem, administrarea intraosoasă, aplicarea tehnicilor experimentale de multiplicare celulară etc) au extins potenţialul de utilizare a acestora la adolescenţi şi adulţi. Noile perspective în domeniul medicinei regenerative oferă diverse aplicaţii de utilizare a grefelor de sânge placentar.

Etapele parcurse la recoltarea la naştere sunt următoarele:

1. Secţionarea cordonului ombilical;
2. Pregătirea prealabilă a cordonului ombilical pentru recoltare, spălare cu ser fiziologic şi pulverizarea din abundenţă a unei substanţe dezinfectante;
3. Recoltarea sângelui rămas la nivelul cordonului ombilical şi la nivelul placentei;
4. Recoltarea de ţesut de cordon ombilical;
5. Recoltarea de ţesut placentar.

Transportul sângelui şi a ţesutului prelavat se face în concordanţă cu prevederile normelor pentru transportul de material biologic. Intervalul de timp de la recoltare pâna la procesarea probei nu trebuie să depăşească 96 de ore pentru sângele placentar, 72 de ore pentru ţesutul de cordon ombilical, şi respectiv 10 ore pentru ţesutul placentar, la temperaturi între 2 şi 22°C. Modul de ambalare al probelor recoltate trebuie să respecte cerinţa de triplă împachetare. Există două strategii de conservare a sângelui placentar: conservarea tuturor elementelor celulare din sângele placentar şi separarea celulară pentru reducerea volumetrică a grefei. Cel de-al doilea tip de procesare reduce volumul materialului biologic şi costul depozitării, dar odată cu îndepărtarea plasmei şi a hematiilor există posibilitatea unei pierderi din numărul total al celulelor utilizabile pentru transplant, dar şi al altor categorii de celule (celulele stem mezenchimale, celule foarte mici asemănătoare celulelor stem embrionare).

Etapele de pregătire a sângelui placentar ca grefă pentru transplant, în laborator:

1. Verificarea integrităţii pungii în care a fost recoltat sângele, etichetarea şi introducerea datelor de identificare în sistemul de administrare a datelor;
2. Evaluarea cantitativă a unităţii de sânge prin aprecierea volumetrică a sângelui recoltat şi aprecierea numărului de celule utilizabile pentru transplant;
3. Eşantionarea probei pentru verificarea sterilităţii şi screeningul agenţilor infecţioşi;
4. Centrifugare fracţionată, pentru a separa plasma de restul componentelor celulare ale sângelui (celulele nucleate utilizabile pentru transplant şi hematiile);
5. Pregătirea unităţii de sânge în vederea criogenării, prin tratarea celulelor cu dimetilsulfoxid (DMSO) pentru a preveni formarea cristalelor de gheaţă şi balonizarea celulară;
6. Criogenarea propriu-zisă prin îngheţare progresivă, pe paliere termice, proces asistat şi monitorizat digital, pâna la atingerea temperaturii finale de -196°C;
7. Depozitarea unităţii de sânge criogenat în vapori de azot, în condiţii termice şi de presiune stabile, pentru o durată îndelungată, ideal pentru tot timpul vieţii donatorului.

Recoltarea celulelor stem la adulţi

Celulele stem pot fi recoltate şi de la pacienţi adulţi, în prezent utilizându-se mai multe surse pentru prelevare: măduva roşie osoasă, sângele periferic, ţesutul adipos, lichidul sinovial şi pulpa dentară. În aceste ţesuturi se găsesc celule stem hematopoietice, celule stem mezenchimale, celule cu potenţial osteogenic şi condrogenic şi adipocite. Identificarea acestora este posibilă prin utilizarea unor tehnici precum:

- Sortarea celulelor cu ajutorul anticorpilor fluorescenți și utilizând un citometru de flux;
- Selectarea cu ajutorul sferelor imunomagnetice;
- Colorarea imunohistochimică;
- Cu ajutorul unor criterii fiziologice și histologice, incluzând fenotipul, proliferarea, chemotaxia, activitatea de mineralizare și diferențierea.

Aplicaţii ale celulelor stem adulte includ:

- Transplantul de celule stem hematopoietice, indicat ca tratament în următoarele boli: anemie aplastică severă, leucemie acută, mielodisplazie, leucemie mieloidă cronică, leucemie limfocitară cronică, talasemie majoră, siclemie, mielom, limfom, boală mieloproliferativă, boli imunodeficitare, anemie Fanconi, dereglări metabolice ereditare, sindroame de insuficiență medulară, anemie diseritropoietică congenitală, trombocitopatie ereditară severă;
- Celulele stem mezenchimale folosite cu succes pentru a repara leziuni ale măduvei spinării și pentru a restabili sensibilitatea și mișcarea în cazul pacienților cu paralizii. Sunt utilizate pentru a trata tulburări degenerative neuronale precum boala Parkinson, paralizia cerebrală, boala Alzheimer și alte asemenea tulburări.
- Condrocitele și osteoblastele, folosite pentru a crește dinți intacți la animale, prezentând un potenţial uriaş pentru stomatologia regenerativă a implanturilor dentare umane.
- Adipocitele, utilizate pentru a trata diferite afecţiuni ale coloanei vertebrale şi probleme ortopedice, boala Crohn, boli cardiovasculare şi, de asemenea utile în chirurgia plastică.

10.2.3. Abordări emergente ale medicinei regenerative

Complementarea blastocistului, combinată cu editarea genelor, constituie o tehnică avansată care ar putea rezolva problema mondială a deficitului de organe şi ţesuturi pentru transplant. În practică, prin complementarea blastocistului au fost generate ţesuturi diferenţiate (pancreatic, renal, pulmonar, vascular, tiroidian etc) şi organe animale funcţionale în himere interspecifice, prin microinjectarea celulelor stem embrionare în blastociştii altei specii. Aceştia au fost anterior modificaţi genetic prin deleţia ţintită a unor gene cu ajutorul tehnologiilor CRISPR sau TALEN, pentru a nu dezvolta organele respective. Din considerente etice au fost induse deficienţe în linia germinală şi neurală (Hashimoto şi colab. 2019). În teorie, metoda poate genera *in vivo* organe sau țesuturi umane complet funcționale, însă o serie de bariere etice şi neajunsuri tehnice rămân în continuare de rezolvat (Crane şi colab. 2019).

Celulele stem pluripotente induse (iPSC) reprezintă celule stem pluripotente generate din celule somatice. Cercetătorii Shinya Yamanaka şi John Bertrand Gurdon, laureaţi ai Premiului Nobel pentru Medicină sau Fiziologie în anul 2012, au demonstrat că celulele mature pot fi reprogramate pentru a deveni pluripotente. Tehnica permite accesul la celule stem pluripotente

derivate de la pacient și revoluționează medicina personalizată, evitându-se astfel respingerile imune sau complicatele strategii de imunosupresie. Deși iPSC umane pot prolifera nelimitat în cultură și pot dispune de potențialul de a genera toate tipurile de celule din corpul adult, funcționalitatea celulelor diferențiate este încă limitată. O strategie alternativă pentru a realiza întregul potențial al iPSC uman pentru medicina regenerativă este generarea de țesuturi şi organe *in vivo* prin complementarea blastocistului.

O perspectivă a iPSC umane, atractivă pentru industria farmaceutică, este oportunitatea de a studia baza celulară şi genetică a bolilor umane. Deoarece iPSC se auto-reînnoiesc și sunt pluripotente, ele reprezintă o sursă teoretic nelimitată de celule derivate de pacienți cu diverse afecţiuni, care pot fi transformate în orice tip de celulă. Acest lucru este deosebit de important, deoarece multe alte tipuri de celule umane derivate de la pacienți tind să nu se mai multiplice după câteva pasaje. iPSC au fost generate pentru o mare varietate de boli genetice umane, inclusiv tulburări frecvente. În multe cazuri, iPSC derivate de la pacienți prezintă defecte celulare care nu au fost observate în celulele de la persoane sănătoase, oferind informații despre fiziopatologia bolii.

La nivel internaţional, există câteva bănci de iPSC umane, precum *New York Stem Cell Foundation Research Institute Repository*, *Coriell-California Institute for Regenerative Medicine*, *RIKEN Bio-Resource Centre*, *Human Induced Pluripotent Stem cell Initiative*, *European Bank for Induced Pluripotent Stem Cells* şi *Stem cells for Biological Assays of Novel drugs and prediCtive toxiCology* (StemBANCC). Liniile celulare din băncile de celule stem nu sunt utilizate în scop clinic, ci sunt destinate exclusiv cercetării şi dezvoltării, ca instrumente pentru screeningul medicamentelor candidat, pentru modelarea *in vitro* a bolilor umane și pentru dezvoltarea metodelor de diagnostic farmacogenetic. Iniţiat în anul 2012, proiectul StemBANCC gestionat de Universitatea din Oxford a generat o colecție de 1.500 de linii celulare iPSC umane de la 500 de voluntari. Participanții au fost pacienți cu una dintre cele nouă antecedente medicale complexe pre-specificate (autism, boala Alzheimer, tulburare bipolară, diabet, migrenă, neuropatie, boala Parkinson, schizofrenie și răspuns advers la medicamentele obișnuite). Proiectul a inclus şi o cohortă de voluntari sănătoși. Au fost prelucrate probe de piele sau păr de la participanți, pentru reprogramarea fibroblastelor în celule stem. Aceste linii celulare au fost apoi caracterizate și utilizate pentru dezvoltarea testelor pe bază de celule pentru screeningul toxicității medicamentelor cu molecule mici (Morrison 2018). Un exemplu de aplicaţie ulterioară îl constituie producerea macrofagelor din linii celulare iPSC umane din colecţia StemBANCC. Macrofagele constituie ţinte principale în dezvoltarea medicamentelor, întrucât o serie de boli sunt asociate cu disfuncţii ale acestor celule: dereglarea sistemului imunitar, boli metabolice, alergice, autoimune, inflamatorii, neurodegenerative și cancer. Macrofagele tisulare sunt greu de izolat din sânge, ţesuturi sau linii celulare neoplazice, iar producția la scară largă de macrofage derivate din iPSC modificate genetic este promiţătoare pentru testarea noilor medicamente (Gutbier şi colab. 2020).

Terapia cu celule CAR-T constituie cel mai avansat tratament al cancerului, ce utilizează celule T modificate genetic pentru a produce un receptor artificial himeric (CAR, *chimeric antigen receptor*). Receptorii sunt himerici deoarece combină atât funcțiile de legare a antigenului, cât și funcțiile de activare a celulelor T într-un singur receptor. Premisa imunoterapiei CAR-T este de a modifica celulele T pentru a recunoaște celulele canceroase spre a le ţinti și distruge eficient. Celulele CAR-T pot fi derivate fie din celule T proprii pacientului (autolog), fie din celule T ale unui alt donator sănătos (alogen) (Depil şi colab. 2020). Odată izolate de la o persoană, limfocitele

T sunt modificate genetic pentru a exprima un CAR specific, care le programează pentru a viza un antigen prezent pe suprafața celulelor tumorale. Pentru siguranță, celulele CAR-T sunt proiectate pentru a fi specifice unui antigen tumoral, care nu este exprimat pe celule sănătoase. Perfuzate unui pacient, celulele CAR-T acționează ca un „medicament viu” împotriva celulelor canceroase. Când intră în contact cu antigenul vizat, celulele CAR-T se leagă de acesta și devin activate, exercitând un efect citolitic asupra celulelor ţintă, apoi continuă să prolifereze și devin citotoxice. Celulele CAR-T distrug celulele prin mai multe mecanisme, inclusiv proliferarea extinsă şi secreția unor citokine precum interleukine și factori de creştere. Dacă reapar celule tumorale, celulele CAR-T le vor recunoaște și distruge (Benmebarek şi colab. 2019). Terapia CAR-T are avantajul că necesită o singură administrare, constituind simultan o triplă terapie: celulară, genică și imunoterapie.

10.2.4. Biofarmaceutice pentru terapii pe bază de celule

Celulele vii constituie cea mai nouă generație de produse terapeutice. Terapiile cu celule vii profită de funcțiile terapeutice naturale ale unor tipuri de celule pentru a regla sau a facilita procesele biologice cheie. De exemplu, celulele stem pluripotente pot reface și vindeca țesuturile iar celulele imune reprogramate pot utiliza sistemul imunitar pentru vaccinare și tratamentul cancerului. Provocările dezvoltării terapiilor pe bază de celule stem îl constituie timpul redus de validitate al celulelor recoltate, cultivate şi modificate *ex vivo*. Câteva biofarmaceutice pe bază de celule stem şi celule proiectate au fost recent aprobate:

- **Holoclar** (Chiesi Farmaceutici) este prima terapie comercială aprobată în Italia (2008) şi apoi în UE (2015) ca medicament orfan destinat deficienței de celule stem de la nivelul limbului (periferia corneei) cauzate de arsuri oculare. Pacienții cu această afecțiune nu au suficiente celule stem la nivelul limbului care, în mod obișnuit, ar acționa ca sistem de regenerare, refăcând celulele de pe suprafața exterioară a corneei atunci când acestea sunt deteriorate și când îmbătrânesc. Holoclar este un produs realizat prin inginerie tisulară şi conţine celule stem autologe corneene multiplicate *ex vivo*, astfel încât să poată repara suprafaţa deteriorată a corneei.
- **Sipuleucel-T** (Provenge, Dendreon Pharmaceuticals) este o imunoterapie oncologică, un vaccin autolog ce conţine celule mononucleate din sângele periferic, recoltate şi modificate cu o proteină de fuziune (antigenul fosfatazei acide produsă de prostată legat de GM-CSF) produsă într-o linie celulară de insecte (Sf21 de la *Spodoptera frugiperda*). Este indicat în tratamentul cancerului de prostată metastatic, asimptomatic, refractar la hormoni. A fost aprobat în anul 2010 în SUA şi în 2013 în UE, însă EMA a retras autorizaţia în anul 2015.
- **Betibeglogene autotemcel** (Zynteglo, Bluebird Bio) este un medicament orfan (2013) destinat pacienţilor cu beta talasemie. Beta talasemia este cauzată de mutații sau deleții ale genei *HBB*, care generează un deficit de lanțuri beta ale hemoglobinei. Terapia genică se bazează pe transferul autolog de celule stem hematopoietice CD34+ transduse *ex vivo* cu un vector lentiviral. LentiGlobin BB305 este un vector retroviral care introduce o versiune funcțională a genei *HBB* în celulele stem hematopoietice, iar celule transformate sunt reinfuzate pacientului.
- **Strimvelis** (GSK) (2016) este un tratament personalizat indicat în imunodeficienţa severă combinată cauzată de deficienţa adenozin deaminazei (ADA-SCID). ADA-SCID este o maladie ereditară rară, cu o incidenţă estimată între 1:200.000 – 1:1.000.000 nou-născuţi. Strimvelis un tratament autolog, celulele stem hematopoietice fiind extrase și purificate astfel încât să rămână

doar celulele care exprimă glicoproteina CD34. Acestea sunt cultivate cu citokine și factori de creștere, apoi transduse cu un gammaretrovirus care conține gena umană adenozin deaminază și reinfuzate bolnavului. Celulele se stabilesc în măduva osoasă unde se multiplică, se maturizează și produc adenozin deaminaza. Înainte de recoltare se aplică o schemă de tratament cu GM-CSF pentru a crește numărul de celule stem, iar înainte de reinfuzie se administrează chimioterapice citotoxice pentru a ucide cât mai multe dintre celulele stem hematopietice ale gazdei şi a crește șansele de supraviețuire pentru noile celule.

- **Zalmoxis** (MolMed) (2016) este indicat ca tratament adăugat în transplantul de celule stem hematopoietice haploidentice (transplant alogen de la rude de gradul 1) la pacienți adulți cu risc crescut de malignități hematologice, în boala grefă contra gazdă. Substanța activă constă din celule T alogene modificate genetic cu un vector retroviral pentru o formă trunchiată a receptorului cu afinitate scăzută pentru factorul uman de creștere neuronală (ΔLNGFR) și timidin kinaza virusului *Herpes simplex* tip 1 (HSV-TK Mut2).
- **Axicabtagen ciloleucel** (Yescarta, Kite Pharma) (2017) este indicat pentru tratarea pacienților adulți cu limfom cu celule B mari. Este un produs de imunoterapie cu celule T autologe modificate genetic, direcționate către CD19 (marker al limfocitelor B). Limfocitele T ale pacientului sunt recoltate și modificate genetic *ex vivo* prin transducție retrovirală pentru a exprima un receptor de antigen himeric (CAR) care cuprinde un fragment variabil cu catenă unică anti-CD19 murin conectat la domeniul costimulator CD28 și un domeniu de semnalare CD3-zeta. Celulele T viabile CAR-pozitive anti-CD19 sunt multiplicate și perfuzate înapoi pacientului, unde pot recunoaște și elimina celulele țintă care exprimă CD19.
- **Tisagenlecleucel** (Kymriah, Novartis) (2017) este o terapie imunocelulară bazată pe celule T autologe, modificate genetic *ex vivo* cu un vector lentiviral care codifică un receptor himeric de antigen anti-CD19. Este dedicat pentru tratarea leucemiei acute limfoblastice şi a limfomului cu celule B mari.
- **Lisocabtagen maraleucel** (Breyanzi, Bristol Myers Squibb) a fost aprobat în anul 2018 în EU. Imunoterapia cu celule T autologe modificate este indicată pentru tratamentul pacienților adulți cu limfom cu celule B mari recidivant sau refractar. Recoltarea limfocitelor T CD8+ și CD4+ se realizează prin leucafereză, urmată de activare, transducție, expansiune, formulare și crioconservare. Imunoreceptorul conţine o proteină de fuziune scFv direcţionată către CD19 şi un domeniu 4-1BB-CD37.
- **Brexucabtagen autoleucel** (Tecartus, Kite Pharma) este un tratament personalizat, indicat pentru tratamentul limfomului cu celule de manta, aprobat în anul 2020. Constituie o imunoterapie autologă cu celule T modificate genetic cu un vector retroviral incapabil de replicare, orientate către CD19.

10.2.5. Produse bioterapeutice vii

Produsele bioterapeutice vii sunt definite ca organisme vii concepute și dezvoltate pentru a trata, vindeca sau preveni o boală sau o afecțiune la om. Această categorie de biofarmaceutice exclude vaccinurile, virusurile filtrabile, oncovirusurile și organismele utilizate ca vectori pentru transferul de gene. Produsele bioterapeutice vii se disting de suplimentele probiotice pe baza încadrării, reglementării şi dezvoltării, deoarece majoritatea probioticelor sunt disponibile ca

suplimente alimentare. Suplimentele alimentare nu parcurg etapele de cerectare preclinică şi clinică specifice medicamentelor, nici regulile de bună practică în fabricaţie, iar în comercializarea lor nu se pot face afirmații legate de tratarea sau prevenirea bolilor. Cu toate acestea, unele probiotice sunt produse bioterapeutice vii și pot fi dezvoltate ca atare dacă au o eficacitate potențială în ceea ce privește boala. Această categorie de produse poate include organisme modificate genetic (recombinate) dacă au fost reprogramate prin adăugarea, deleţia sau modificarea materialului genetic al organismului proiectat. Atât în UE, cât și în SUA, dezvoltarea lor necesită demonstrarea calității prin stabilirea siguranței, fiabilității, robusteții și consistenței fiecărui lot produs. De asemenea, acestea trebuie investigate în studii clinice bine controlate la populația de pacienți intenționați pentru a stabili siguranța și eficacitatea. Până în prezent nu a fost aprobat niciun produs bioterapeutic viu recombinat, dar există studii clinice în derulare. Farmacopeea europeană a stabilit standardele de calitate pe care trebuie să le îndeplinescă aceste produse (The European Pharmacopoeia Commission 2019).

Microbiomul se referă la habitatul, condițiile de viață și genomul colectiv al unei microbiote. Se aproximează că tractul gastrointestinal uman conține 4×10^{13} bacterii, mai mult decât numărul total de celule proprii. Termenul de hologenom (genom holobiont) descrie combinația genomului gazdei (la om ~ 20.000 de gene) și a genomurilor microbiene colective asociate (> 33 de milioane de gene), dintre care 9 milioane sunt gene unice care codifică proteine. Rezidenții noștri microbieni își extind astfel substanțial repertoriul genetic și ne conferă abilități de adaptare pe care nu le-am putea realiza în lipsa lor (Harper şi colab. 2021). Lansat în anul 2007, Proiectul Microbiomului Uman a permis caracterizarea și înțelegerea importanței microbiomului în starea de sănătate și respectiv asocierea unor disturbări ori disfuncţionalităţi ale acestuia cu anumite afecţiuni sau boli umane. Compoziţia microbiotei asociate organismului uman este decisă încă de la naştere, evoluează de-a lungul vieţii şi este influenţată la rândul ei de factori precum condiţiile de mediu, starea de sănătate, dieta, stilul de viaţă şi rutina personală. Modificările calitative și cantitative ale microbiotei, ale activității sale metabolice și ale distribuției acesteia poartă numele de disbioză. Acest dezechilibru este implicat în apariția unor tulburări localizate (la nivel tegumentar, respirator, digestiv), dar și a unor boli sistemice (obezitate, sindrom metabolic, boli cardiovasculare și vasculare periferice, astm bronșic și atopii, tulburări neurologice, alterarea capacității de metabolizare a unor medicamente). Studiile de descifrare a compoziţiei microbiomului uman şi a impactului unor germeni asupra acestuia au adus multe rezultate:

- În microbiota sugarilor născuţilor pe cale naturală predomină lactobacilii, iar în cazul celor născuţi prin cezariană stafilococii şi *E. coli*;
- Abundenţa *Actinomyces viscosus* şi *A. naeslundii* la nivelul cavităţii bucale conduce la persistenţa plăcii dentare;
- În cazul unor afecţiuni ale pielii, s-a demonstrat că speciile de *Malassezia* sunt asociate cu dermatita atopică, *Cutibacterium acnes* şi *Malassezia* sp. cu unele forme de acnee iar *Acremonium* sp. predomină la persoanele cu scalpul afectat de mătreaţă;
- S-a observat o legătură între microbiota sistemului respirator şi severitatea afecţiunilor astmatice: speciile de *Stafilococcus*, *Streptococcus* și *Moraxella* au fost asociate cu agravarea bolii, în timp ce *Corynebacterium* și *Dolosigranulum* au fost asociate cu îmbunătăţirea stării de sănătate;
- Abundenţa anumitor familii bacteriene în tubul digestiv este asociată cu boli inflamatorii intestinale (boala Crohn, colita ulcerativă), obezitate şi chiar cu probleme de sănătate mintală

precum depresia şi anxietatea (Abenavoli şi colab. 2019; Alam şi colab. 2020; Limbana şi colab. 2020).

- Deși cancerul este, în general, o boală atribuită bagajului genetic și factorilor de mediu, microorganismele (oncobacterii şi oncovirusuri) sunt implicate în aproximativ 20% din cancerele umane. Microbiota bacteriană poate afecta carcinogeneza în trei moduri largi: (i) modificarea echilibrului dintre proliferarea şi apoptoza celulelor tumorale; (ii) reglarea funcției sistemului imunitar și (iii) influențarea metabolismului factorilor produși de gazdă, a alimentelor și produselor farmaceutice. În prezent, densitatea microbiană poate fi utilizată ca instrument de prognostic în evaluarea cancerelor colorectale. S-a concluzionat că prezenţa unor specii bacteriene este direct asociată riscului cancerigen: *Helicobacter pylori* pentru cancer gastric, *H. hepaticus*, *H. bilis* şi *Salmonella typhi* pentru cancerul vezicii biliare, *Campylobacter jejuni* pentru limfom intestinal, *Porphyromonas gingivalis* pentru cancerul pancreatic, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma* sp., *Chlamydia pneumoniae*, *C. trachomatis* şi *C. psittaci* pentru cancerul pulmonar, *Streptococcus bovis* şi *S. gallolyticus* pentru cancerul colorectal (Cummins şi Tangey 2013; Garrett 2015).

Totodată, în microbiota umană au fost identificate o serie de bacterii căror prezenţă are efecte benefice asupra stării de sănătate. Dovezile sugerează că diferite bacterii comensale și probiotice influențează mecanismele organismului gazdă, cu o relevanță importantă pentru terapia şi prevenţia unei game variate de afecţiuni gastrointestinale, respiratorii, neurodegenerative şi infecţii. Microbiota intervine în reglarea metabolismului, a funcţiei neuroendocrine, a răspunsului inflamator şi imun. Mecanismele responsabile sunt atât directe, cât și indirecte și includ: funcția îmbunătățită a barierei mucoasei, secreția de peptide antimicrobiene şi antiinflamatorii, inhibarea atașării patogenilor la celulele gazdă şi modularea funcției leucocitelor responsabile de imunitatea înnăscută și adaptativă. Astfel, în categoria terapiilor pe bază de celule vii sunt încadrate microorganismele ce pot interacționa cu microbiomul gazdei pentru a regla imunitatea mucoasei, procesele metabolice și procesele inflamatorii. Astfel de terapii se bazează pe administrarea unor bacterii cu eficienţă terapeutică dovedită, sub forma de celule vii sau bacterii viabile liofilizate.

Una din strategiile bacterioterapiei disbiozei implică transplantul fecal (autolog sau de la donatori sănătoşi), ale cărui beneficii sunt investigate în peste 400 de studii clinice. Peste 100 de studii clinice au fost finalizate, vizând afecţiuni gastrointestinale (sindromul intestinului iritabil, boala Crohn, colita ulcerativă, colangita sclerozantă, bolile hepatice, pancreatita, obstrucţia intestinală, constipaţia, diareea indusă de medicamente, infecţiile cu *Clostridium difficile*, colonizarea cu germeni multirezistenţi), urinare (bolile renale, infecţiile urinare recurente), obezitatea, sindromul metabolic, scleroza multiplă, boala Parkinson, artrita psoriazică, infecţia cu HIV, CMV, diverse forme de cancer, boli autoimune (sindrom Sjogren) sau alergii (arahide).

O serie de suplimente alimentare conţinând bacterii vii au parcurs etapele cercetării clinice demonstrând beneficii în diverse afecţiuni:

- *Bifidobacterium* sp. în infecţia cu *H. pylori*, boală celiacă, diabet etc;
- *B. longum* în diareea asociată tratamentului cu antibiotice, sindromul intestinului iritabil etc;
- *B. bifidum* pentru stimularea dezvoltării prematurilor;
- *B. breve* în obezitate;
- *Blautia hydrogenotrophica* în sindromul intestinului iritabil;
- *Lactobacillus reuteri* în boli periodontale şi alergii;
- *L. acidophilus, L. casei* şi *L. rhamnosus* în sindromul intestinului iritabil;

- *L. casei, L. plantarum, Streptococcus faecalis* şi *Bifidobacterium breve* pentru prevenirea şi decolonizarea bacteriilor rezistente la antibiotice;
- *L. rhamnosus* în pneumonia asociată ventilării mecanice;
- *L. plantarum* în boli inflamatorii etc.

Instaurarea şi progresia patologiilor umane este legată de mai mulți factori, ce includ răspunsul imun deficitar, predispoziția genetică și disbioza, iar interacțiunea complexă dintre acești factori a împiedicat în mare măsură dezvoltarea unor terapii eficiente. În prezent, terapia bacteriană cu celule modificate genetic oferă perspective promiţătoare. Cercetarea şi dezvoltarea bioterapeuticelor pe bază de bacterii vii modificate genetic a avansat o serie de candidaţi aflaţi în diverse stadii clinice:

- AG013 (Orgagenics), AG014 şi AG019 (ActoBioTherapeutics) conţin tulpini de *Lactococcus lactis*, cu indicaţii terapeutice în mucozită orală, inflamaţie gastrointestinală, imunodeficienţă primară şi diabet de tip 1;
- ADXS-HOT, ADX-HPV şi ADX-PA (Advaxis Immunotherapies) conţin tulpini de *Lysteria monocytogenes* al căror efect este investigat în cancerul pulmonar cu celule non-mici, cancerul asociat infecţiei cu HPV şi în metastazele prostatei;
- AS001F (Anaeropharma Science) şi bacTRL-IL-12 (Symvivo) investighează efectele *Bifidobacterium longum* asupra pacienţilor cu tumori solide;
- AZT-04 (Azitra) conţine tulpini de *Staphylococcus epidermidis,* investigat în ameliorarea erupţiilor asociate terapiei oncologice;
- MRx 1234 sau Blautix (4D Pharma) cu tulpini liofilizate de *Blautia hydrogenotrophica* izolate de la donatori sănătoşi, indică îmbunătăţirea simptomatologiei la pacienţii cu sindromul intestinului iritabil;
- SYNB1020, SYNB1618 şi SYNB1891 (Synlogic) testează tulpina *E. coli* Nissle 1917 în hiperamoniemie, fenilcetonurie şi tumori solide;
- VXM01 (VAXIMM) investighează tulpina *Salmonella* Typhi Ty21a în glioblastom progresiv.

Se evidenţiază însă câteva considerații suplimentare specifice privind dezvoltarea clinică a terapiilor cu bacterii vii modificate genetic:

1. Furnizarea către autorităţi a secvenţei transgenei şi a secvenţei complete a genomului pentru tulpina proiectată, împreună cu dovezi care să susțină stabilitatea în timp a acestor modificări.
2. Asigurarea că organismul proiectat nu poate transfera orizontal casete de rezistență la antibiotice către alți membri ai microbiotei rezidente. O modalitate de a aborda această preocupare este de a elimina toate genele cunoscute sau suspectate de rezistență la antibiotice utilizate în crearea tulpinii proiectate, sau prezente în bacteria utilizată.
3. Caracterizarea capacităţii microorganismului de a se replica sau de a persista în gazdă și / sau în mediul înconjurător; încorporarea unor strategii de biocontenție pentru a restricționa replicarea tulpinii candidate în corp.
4. Determinarea timpului de persistenţă și eliminarea organismului modificat din corp, indiferent de includerea strategiilor de biocontenție. O abordare pentru a caracteriza mai bine tulpina este de a studia mai întâi clearance-ul fecal al tulpinii administrate oral la primate neumane și voluntari sănătoși.
5. Determinarea biodistribuirii organismului modificat în afara situsului său țintă (de exemplu, tractul gastro-intestinal sau tumorile solide) (Charbonneau şi colab. 2020).

11. ABORDĂRI COMPLEXE. TERAPIA ONCOLOGICĂ

Dezvoltarea noilor biofarmaceutice pentru terapia bolilor oncologice a cunoscut un avans semnificativ. Eforturi uriaşe se întreprind pentru diagnosticarea precoce şi tratarea cancerului, acest domeniu fiind unul dintre cele mai vizate de către medici şi cercetători.

Procesul de transformare a unei celule normale în celulă tumorală se numeşte oncogeneză. În cadrul acestui proces au loc modificări la nivel celular, genetic şi epigenetic, ce conduc la reprogramarea celulei pentru diviziune necontrolată, rezultând o masă celulară denumită tumoră. Tumorile maligne invadează alte organe şi se diseminează la distanţă (metastazează), fiind incompatibile cu viaţa. Tumorile benigne nu se răspândesc în alte ţesuturi şi sunt incompatibile cu viaţa doar când afectează structuri active fiziologic. În prezent se diferenţiază peste 120 de tipuri de cancer ce afectează diverse organe, toate fiind potenţial letale. Principalele tipuri de cancer sunt carcinomul, sarcomul, melanomul, limfomul și leucemia.

Chimioterapia sistemică clasică include:

1. Terapiile cu citostatice citotoxice (agenţi alchilanţi), ce formează legături covalente cu molecula de ADN având efect antineoplazic (împiedică mitoza), sunt utilizate pentru tratarea leucemiei, limfomului, mielomului, sarcomului, a cancerului pulmonar, mamar, ovarian. Exemple: derivaţi de azotiperită (clormetină, clorambucil, ciclofosfamidă, ifosfamidă, melfalan), alchilsulfonaţi (busulfan), nitrozourea (streptozotocină, carmustină, lomustină), triazine (dacarbazină), etilenimine (tiotepa, altretamină), derivaţi de platină şi germaniu (cisplatină, carboplatină, oxaliplatină) etc.

2. Antimetaboliţii cu acţiune citostatică (antimetaboliţi ai acidului folic, antimetaboliţi cu nucleu purinic, antimetaboliţi cu nucleu pirimidinic), care interferează în faza S a ciclului celular, fiind incluşi în scheme chimioterapice în leucemie, cancer ovarian şi mamar. Exemple: 5-fluorouracil, 6-mercaptopurină, citarabină, capecitabină, fludarabină, gemcitabină, metotrexat, pemetrexed, pentostatină, tioguanină etc.

3. Antibioticele citotoxice, ce acţionează prin inhibarea topoizomerazelor de tip II, intercalarea între catenele ADN sau generarea de specii reactive de oxigen. Sunt utilizate pentru tratarea multor tipuri de cancer, inclusiv leucemie, limfom, cancer pulmonar, mamar, uterin, ovarian, gastric, urinar şi pumonar. Exemple: antracicline (doxorubicină, daunorubicină, idarubicină, epirubicină), actinomicină, bleomicină, mitomicină C etc.

4. Alcaloizii vegetali, ce întrerup faza M a ciclului celular, stopând mitoza prin acţiuni asupra sistemului de microtubuli, ori inhibă topoizomerazele de tip I, sunt utilizaţi pentru tratarea cancerului mamar, pulmonar, ovarian, intestinal, a mielomului, limfomului și leucemiei. Exemple: taxani derivaţi din extracte obţinute de la genul *Taxus* (paclitaxel și docetaxel), alcaloizi vinca derivaţi de la *Vinca rosea* (vinblastină, vincristină și vinorelbină), derivaţi de captotecină de la *Camptotheca acuminata* (topotecan, irinotecan) etc.

5. Lignanii citotoxici precum derivaţii de podofilotoxină (*Podophyllum peltatum*) au diverse efecte antimitotice, cum ar fi perturbarea microtubulilor prin legare de tubulină, inhibarea topoizomerazelor de tip II, fiind utilizaţi cu succes în terapia împotriva numeroaselor tipuri de cancer, inclusiv testicular, mamar, pancreatic, pulmonar, gastric și ovarian. Exemple: procarbazină, etopozid, tenipozid etc.

6. Agenţii hormonali pot fi hormoni naturali, cum sunt hormonii steroizi, precum și analogi sintetizaţi artificial. Efectele biologice ale hormonilor steroizi sunt mediate de receptori intracelulari specifici fiecărei clase de steroizi, precum receptorii glucocorticoizilor. Activarea acestor proteine citoplasmatice şi translocarea lor în nucleu implică legarea de secvenţe specifice ale ADN şi alterarea transcrierii. Sunt administraţi pentru tratarea limfomului, leucemiei și mielomului multiplu. Exemple: prednison, metilprednisolon, dexametazonă etc.

Chimioterapia sistemică modernă adaugă terapii ţintite:

7. Anticorpii monoclonali se ataşează celulei canceroase acţionând specific: ca markeri ce stimulează răspunsul imun (alemtuzumab, rituximab), blochează antigene implicate în creşterea celulelor tumorale (cetuximab, trastuzumab), inhibitori ai angiogenezei (bevacizumab). Anticorpii monoclonali pot fi conjugaţi cu alte particule, fie marcaţi radioactiv (ibritumomab tiuxetan), fie conjugaţi cu alte substanţe medicamentoase (brentuximab vedotin, ado-trastuzumab emtanizină). Există şi medicamente compuse din doi anticorpi monoclonali ce se pot lega de două proteine simultan (blinatumomab). Anticorpii monoclonali au importante roluri antitumorale, iar medicamentele lansate recent sunt numeroase, spre exemplu brentuximab vedotin (Adcetris) recomandat în tratamentul limfomului Hodgkin şi a limfomului anaplazic cu celule mari. Este vorba de un complex anticorp-medicament (*antibody-drug compound*, ADC) ce oferă un agent antineoplazic (monometil auristatina E) care determină moartea celulelor apoptotice în mod selectiv în celulele tumorale ce exprimă proteina membranară CD30. Legarea complexului ADC de CD30 la suprafaţa celulelor iniţiază internalizarea complexului ADC-CD30, care ajunge apoi în compartimentul lizosomal. În interiorul celulei, monometil auristatina E este eliberată prin scindare proteolitică, se leagă de tubulină dizlocând reţeaua microtuburilor, induce oprirea ciclului celular şi moartea apoptotică a celulelor tumorale CD30+.

În funcţie de ţinta lor, anticorpii monoclonali pot fi:

- cu ţinte la receptorii transmembranari: inhibitorii EGFR (sau HER1) precum cetuximab (cancer de colon, rect, ORL, pulmonar cu celule non-mici, cancer de piele non-melanom), panitumumab (cancer de colon, penis, rect); inhibitorii HER2 (ErbB2 sau HER2/neu): trastuzumab (cancer mamar, gastric, esofagian), pertuzumab şi emtazină-trastuzumab (cancer de sân);
- cu ţinte pe sistemul imunitar, legând antigene de suprafaţă: alemtuzumab (anticorp anti-CD52 utilizat pentru limfoame non-Hodgkin şi macroglobulinemia Waldenström), ofatumumab (anticorp anti-CD20 cu aceleaşi indicaţii), brentuximab vedotin (anticorp anti-CD30), ipilimumab (anticorp anti-CTLA4 în tratamentul melanoamelor), ibritumomab tiuxetan (anticorp anti-CD20 ce eliberează substanţe radioactive, utilizat pentru unele limfoame non-Hodgkin), obinutuzumab (anticorp anti-CD20 recomandat pentru unele limfoame non-Hodgkin), rituximab (anticorp anti-CD20 utilizat pentru leucemie limfoblastică acută, cancer ale sistemului nervos central, Boala Hodgkin, limfoame non-Hodgkin şi macroglobulinemie Waldenström);

- cu ţinte ale angiogenezei, precum inhibitorii VEGFR: bevacizumab (cancer de sân, sistem nervos central, col uterin, colon, rinichi, ovar, rectal, sarcoame, cancer pulmonar cu celule non-mici).

8. Inhibitorii tirozin-kinazei, ce blochează activitatea enzimei fie concurând cu ATP, entitatea fosforilantă, cu substratul, sau cu ambele, fie acționând într-un mod alosteric, printr-o schimbare conformațională, legându-se de un situs din afara situsului activ. În celulă, tirozin-kinazele catalizează fosforilarea transferând o grupare fosfat din ATP în resturile de tirozină ale proteinelor specifice, rol important în multiple funcții celulare. Dintre tipurile de receptori tirozin-kinazici ţintiţi de citostatice sunt: VEGFR (axitinib – cancer renal), EGFR (erlotinib, gefitinib – cancer osos, esofagian, renal, pancreatic, pulmonar cu celule non-mici), ai PDGFR (nilonitib – leucemie acută limfoblastică, leucemie mieloidă şi sarcoamele ţesuturilor moi) etc. Tirozin-kinazele fără receptori sunt enzime citosolice cu rol esenţial în transmiterea semnalului în limfocite T şi B, precum kinazele Janus (JAK), ţintite de ruxolitinib, medicament orfan dezvoltat împotriva mielofibrozei şi a cancerului pancreatic. Medicamentele inovatoare de ultimă generaţie sunt inhibitori multikinazici: bosutinib, crizotinib, dasatinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, pazopanib, ponatinib, regorafenib, sorafenib, sunitinib, vandetanib etc, fiecare indicat în anumite afecţiuni oncologice.

9. Inhibitorii m-TOR, ce reprezintă ţinta rapamicinei în celulele mamiferelor, o protein-kinază care fosforilează serina şi treonina, reglând astfel creşterea şi proliferarea celulară, sinteza proteinelor, transcripţia şi autofagia: rapamicina, ridaforolimus, everolimus, temsirolimus.

10. Retinoizii (derivați naturali și sintetici ai vitaminei A), ce manifestă efecte importante de diferențiere și de supresie a creșterii în diverse celule normale, premaligne și maligne. Noile medicamente ţintesc receptorii acidului retinoic şi receptorii retinoizilor: alitretinoină, bexaroten, izotretinoină, tamibaroten, tretinoină etc.

11. Imunoterapia este specifică fiecărui tip de boală oncologică şi include:

- ***Inhibitori ai punctelor de control (checkpoint inhibitors*)** precum proteinele specifice limfocitelor T: PD-1 (cemiplimab, nivolumab, pembrolizumab), PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab) sau CTLA-4 (ipilimumab) etc.
- ***Inhibitorii deacetilazei histonelor***, care induc alterarea exprimării genice, precum romidepsină, valproat şi vorinostat.
- ***Antagoniştii receptorilor Smoothened*** (SMO), ce funcţionează ca inhibitori ai căii Hedgehog (importantă la făt): vismodegib (cancer de piele non-melanom şi alte tipuri de cancer).
- ***Inhibitorii proteasomici*** (inele de proteine ce descompun alte proteine): bortezomib şi carfilzomib (mielom multiplu).
- ***Terapia celulară cu celule T care exprimă receptori himerici*** (CAR-T), cum este receptorul CD19 anumite tipuri de leucemie sau limfom: tisagenlecleucel, axicabtagen ciloleucel, brexucabtagen autoleucel etc.
- ***Modulatori ai răspunsului imun*** de tipul citokinelor ce stimulează sistemul imunitar în lupta cu cancerul: interferon α, interleukina 2 etc.
- ***Virusuri oncolitice*** conţinute în preparate concepute pentru a distruge tumori şi a stimula răspunsul imun: *Herpes simplex* (talimogene laherparepvec), adenovirus H101 (Oncorine), ecovirusul ECHO-7 (Rigvir) - aprobate pe piaţă, iar virusul vaccinei, virusul stomatitei veziculare, poliovirusul şi alte virusuri modificate sunt în diferite stadii de cercetare.

- ***Vaccinuri oncologice*** ce pot fi preventive, spre exemplu anti-HPV (Cervarix, Gardasil) sau anti-HBV (Engerix-B, HBVAXPRO) ori terapeutice împotriva cancerului de prostată (Prostvac, Sipuleucel-T), împotriva cancerului pulmonar (CimaVax-EGF), împotriva melanomului (talimogene laherparepvec) etc.

Scopul principal al tratamentelor cu agenţi chimioterapici este de a preveni ca celulele canceroase să se multiplice, să invadeze, să metastazeze şi în final să ucidă gazda. Chimioterapia oncologică acţionează pe principiul toxicităţii selective, în care o substanţă medicamentoasă ucide selectiv celulele neoplazice, fără a afecta celulele normale. În general, citostaticele citotoxice îşi exercită efectele asupra proliferării celulare şi creşterii tumorale. Deoarece multiplicarea celulară este o caracteristică a majorităţii celulelor normale şi canceroase, citostaticele îşi exercită efectele toxice asupra tuturor celulelor cu o rată rapidă de diviziune, inclusiv cele din măduva osoasă, celulele germinale, foliculii firului de păr, celulele mucoaselor etc. De aici derivă efectele secundare ale chimioterapiei: mielosupresia şi în consecinţă imunosupresia, mucozita, alopecia. O caracteristcă esenţială este a chimioterapiei clasice este absenţa unei specificităţi absolute asupra celulei canceroase. În cazul chimioterapicelor clasice este foarte importantă cunoaşterea ferestrei terapeutice, adică a dozei necesare pentru obţinerea concentraţiei plasmatice a substanţei medicamentoase care să ofere beneficii optime. Clinic, se urmăreşte o mare probabilitate de succes terapeutic, definit prin micşorarea tumorii, dar fără a creşte efectele toxice. Fereastra terapeutică poate să difere la nivel individual, în contextul polimorfismului genetic în ceea ce priveşte metabolizarea substanţei medicamentoase, ţinta biologică a medicamentului, receptorii, transportorii şi alţi factori ce pot interacţiona cu activitatea agenţilor chimioterapeutici (Malhotra şi Perry 2003).

Un beneficiu relevant al tratamentelor oncologice inovative este acela că nu au efect citotoxic generalizat, ci constituie terapii ţintite, cum este cazul anticorpilor monoclonali ce ţintesc proteine exprimate anormal în celulele canceroase. Unele chimioterapice sunt utilizate şi în alte afecţiuni, precum scleroza multiplă, boala Crohn, amiloidoza, artrita reumatoidă, spondilita anchilozantă, psoriazis, lupus eritematos, scleroderma.

O serie de strategii implică administrarea simultană a mai multor medicamente în chimioterapia cancerului. În funcţie de organele afectate de boala oncologică sunt disponibile protocoale prestabilite, care sunt permanent adaptate noutăţilor clinice şi farmaceutice.

Biomarkerii şi medicina translaţională

Medicina translațională este o disciplină emergentă care implică traducerea rezultatelor de laborator în proiectarea și aplicarea studiilor clinice în stadiu incipient. Se concentrează pe traducerea datelor preclinice din studiile *in vivo*, *in vitro* și *in silico* în clinică pentru a ajuta la proiectarea studiilor, a determina metodele și a alege biomarkerii. În plus, utilizează datele din studiile clinice pentru a se reîntoarce în experimente preclinice şi a îmbunătăți descoperirea viitoarelor medicamente.

Odată cu dezvoltarea tehnologiilor genomice și a terapiilor moleculare ţintite, biomarkerii joacă un rol din ce în ce mai important în managementul clinic al pacienților cu cancer şi nu numai. Un biomarker reprezintă o caracteristică măsurabilă în mod obiectiv, care descrie o stare biologică

normală sau anormală într-un organism prin analiza biomoleculelor precum ADN, ARN, proteine, peptide și modificări chimice ale biomoleculelor. Conform WHO, un biomarker este orice substanță, structură sau proces care poate fi măsurată în organism sau în produse și influențează sau prezice incidența rezultatului sau a bolii.

Strategiile de prevenţie și terapie iau în considerare variabilitatea individuală, fiind introduse analize bazate pe amprentarea uneia sau a mai multor gene ori proteine ca biomarkeri predictivi pentru diferite tipuri de cancer. În ceea ce privește utilitatea clinică, un biomarker oncologic poate măsura riscul de a dezvolta cancer într-un țesut specific sau, alternativ, poate reflecta riscul de progresie a cancerului sau răspunsul potențial la terapie.

Pe baza utilizării lor, biomarkerii oncologici pot fi clasificați în următoarele categorii:

1. Biomarkeri cu valoare predictivă, capabili să prezică răspunsul la intervenții terapeutice specifice (de exemplu activarea HER2, care prezice răspunsul la trastuzumab în cancerul de sân);
2. Biomarkeri cu valoare de prognostic, ce reflectă riscul clinic, recurența cancerului sau progresia bolii (de exemplu scorul de recidivă cu 21 de gene pentru recurența cancerului de sân tratat cu tamoxifen);
3. Biomarkeri de diagnostic, utilizaţi pentru a identifica dacă un pacient are o afecțiune specifică (de exemplu testul Cologuard ce detectează mutaţii multigenice specifice cancerului colorectal, testarea microARN circulant pentru cancer pancreatic etc).

Cu toate că există încă un decalaj între studiile inițiale de descoperire a biomarkerilor, validarea și implementarea lor clinică, perspectivele pentru medicina personalizată sunt încurajatoare (Goossens şi colab 2015).

Bibliografie

Abbott TR, Dhamdhere G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS. 2020. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. *Cell* **181**(4):865-876.

Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aiello V, Romano B, De Lorenzo A, Izzo AA, Capasso R. 2019. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients* **11**(11):2690.

Abian O, Mateo C, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Laufente R. 2008. Improving the industrial production of 6-APA: Enzymatic hydrolysis of penicillin G in the presence of organic solvents. *Biotechnology Progress* **19**(6):1639-1642.

Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, Ye SH, Boehm CK, Kosoko-Thoroddsen TF, Kehe J, Nguyen TG, Carter A, Kulesa A, Barnes JR, Dugan VG, Hung DT, Blainey PC, Sabeti PC. 2020 Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature* **582**(7811):277-282.

Adivitiya, Khasa YP. 2017. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. *Bioengineered* **8**(4):331-358.

Ahmed MA, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. 2020. Colistin and its role in the era of antibiotic resistance: An extended review (2000–2019). *Emerging Microbes and Infections* **9**(1):868-885.

Akinc A, Maier MA, Manoharan M, Fitzgerald K, Jayaraman M, Barros S, Ansell S, Du X, Hope MJ, Madden TD, Mui BL, Semple SC, Tam YK, Ciufolini M, Witzigmann D, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR. 2019. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotechnology* **14**(12):1084-1087.

Alam MT, Amos GCA, Murphy ARJ, Murch S, Wellington EMH, Arasaradnam RP. 2020. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathogens* **12**:1.

Alberti F, Khairudin K, Venegas ER, Davies JA, Hayes PM, Willis CL, Bailey AM, Foster GD. 2017. Heterologous expression reveals the biosynthesis of the antibiotic pleuromutilin and generates bioactive semi-synthetic derivatives. *Nature Communications* **8**(1):1831.

Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* **1**:134.

Anasir MI, Poh CL. 2019. Structural vaccinology for viral vaccine design. *Frontiers in Microbiology* **10**:738.

Artsimovitch I, Seddon J, Sears P. 2012. Fidaxomicin is an inhibitor of the initiation of bacterial RNA synthesis. *Clinical Infectious Diseases* **55**(S2):S127-131.

Averianova LA, Balabanova LA, Son OM, Podvolotskaya AB, Tekutyeva LA. 2020. Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**:570828.

Awan A, Blount B, Bell D, Shaw DM, Ho JCH, McKiernan RM, Ellis T. 2017. Biosynthesis of the antibiotic nonribosomal peptide penicillin in baker's yeast. *Nature Communications* **8**:15202.

Baghban R, Farajnia S, Ghasemi Y, Mortazavi M, Samadi N, Zarghami N. 2021. Assessment of *E. coli* expression system for overexpression of active recombinant ocriplasmin. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **11**(3):564-569.

Ban YH, Song MC, Hwang J, Shin HI, Kim HJ, Hong SK, Lee NJ, ParkJW, Cha SS, Liu H, Yoon YJ. 2019. Complete reconstitution of the diverse pathways of gentamicin B biosynthesis. *Nature Chemical Biology* **15**(3):295–303.

Barrios-Gonzales J, Miranda RU. 2010. Biotechnological production and applications of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**(4):869-883.

Bartoszewska M, Opaliński L, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2011. The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnological Lettets* **33**(10):1921-1931.

Beitelshees M, Hill A, Rostami P, Jones CH, Pfeifer BA. 2017. Pressing diseases that represent promising targets for gene therapy. *Discovery Medicine* **24**(134):313-322.

Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. 2019. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *International Journal of Molecular Sciences* **20**(6):1283.

Bernstein DI, Guptil J, Naficy A, Nachbagauer R, Berlanda-Scorza F, Feser J, Wilson PC, Solórzano A, Van der Wielen M, Walter EB, Albrecht RA, Buschle KN, Chen Y, Claeys C, Dickey M, Dugan HL, Ermler ME, Freeman D, Gao M, Gast C, Guthmiller JJ, Hai R, Henry C, Lan LYL, McNeal M, Palm AKE, Shaw DG, Stamper CT, Sun W, Sutton V, Tepora ME, Wahid R, Wenzel H, Wohlbold TJ, Innis BL, García-Sastre A, Palese P, Krammer F. 2020. Immunogenicity of chimeric hemagglutinin-based, universal influenza virus vaccine candidates: Interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Lancet Infectious Diseases* **20**(1):80-91.

Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, Martins LT, Tavares KC, Bertolini M, Murray JD. 2016. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research* **25**(3):329-343.

Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. 2021. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Therapy* **28**(3-4):117-129.

Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. 2007. Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews* **6**(12):975-990.

Brandao PRP, Titze-de Almeida SS, Titze-de Almeida R. 2020. Leading RNA interference therapeutics part 2: Silencing delta-aminolevulinic acid synthase 1, with a focus on Givosiran. *Molecular Diagnosis and Therapy* **24**(1):61-68.

Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, Zotchev SB. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry and Biology* **7**(6):395-403.

Buchholz CJ, Friedel T, Büning H. 2015. Surface-engineered viral vectors for selective and cell type-specific gene delivery. *Trends in Biotechnology* **33**(12):777-790.

Buchholz K. 2016. A breakthrough in enzyme technology to fight penicillin resistance-industrial application of penicillin amidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**(9):3825-3839.

Burke JM, Lamm DL, Meng MV, Nemunaitis JJ, Stephenson JJ, Arseneau JC. 2012. A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *The Journal of Urology* **188**(6):2391-2397.

Butiuc-Keul A. 2014. *Biotehnologie generală*. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.

Butiuc-Keul A, Carpa R, Podar D, Muntean V, Iordache D, Farkas A. 2021. Antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. through the urban water cycle. *Current Microbiology* **78**(4):1227-1237.

Butiuc-Keul A, Farkas A, Carpa R, Iordache D. 2021. CRISPR-Cas system: The powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes. *Microbial Physiology* doi: 10.1159/000516643.

Butler D. 2019. Promising malaria vaccine to be tested in first large field trial. *Nature* doi:10.1038/d41586-019-01232-4.

Caffrey P, Lynch S, Flood E, Finnan S, Oliynyk M. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Cell Chemical Biology* **8**(7):713-723.

Cai L, Fisher AL, Huang H, Xie Z. 2016. CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes and Diseases* **3**(4):244-251.

Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. 2020. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research* **178**:104787.

Cane DE. 2010. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **285**(36):27517-27523.

Cao Y, Peng Q, Li S, Deng Z, Gao J. 2019. The intriguing biology and chemistry of fosfomycin: The only marketed phosphonate antibiotic. *The Royal Society of Chemistry Advances* **9**(72):42204-42218.

Carolus H, Pierson S, Langrou K, Van Dijk P. 2020. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *Journal of Fungi* **6**(4):321.

Carratalá JV, Cano-Garrido O, Sánchez J, Membrado C, Pérez E, Conchillo-Solé O, Daura X, Sánchez-Chardi A, Villaverde A, Arís A, Garcia-Fruitós E, Ferrer-Miralles N. 2020. Aggregation-prone peptides modulate interferon gamma functionality in naturally occurring protein nanoparticles. *New Biotechnology* **57**:11-19.

Casadevall A, Pirofski L. 2020. The convalescent sera option for containing COVID-19. *The Journal of Clinical Investigation* **130**(4):1545-1548.

Castaman G, Matino D. 2019. Hemophilia A and B: Molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica* **104**(9):1702-1709.

Cepelowicz Rajder J, Sherman M, Fatteh N, Vogel F, Sacks J, Rajter JJ. 2021. The ivermectin in COVID nineteen study. *Chest* **159**(1):85-92.

Charbonneau MR, Isabella VM, Li N, Kurtz CB. 2020. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. *Nature Communication***s** **11**(1):1738.

Chen D, Feng J, Huang L, Zhang Q, Wu J, Zhu X, Duan Y, Xu Z. 2014. Identification and characterization of a new erythromycin biosynthetic gene cluster in *Actinopolyspora erythraea* YIM90600, a novel erythronolide-producing halophilic actinomycete isolated from salt field. *PlosONE* **9**(9):e108129.

Clardy J, Fischbach M, Currie C. 2009. The natural history of antibiotics. *Current Biology* **19**(11):R437-R441.

Clatworthy A, Pierson E, Hung D. 2007. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology* **3**(9):541-548.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Baretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**(6121):819-823.

Conti G, Pollegioni L, Molla G, Rosini E. 2014. Strategic manipulation of an industrial biocatalyst-evolution of a cephalosporin C acylase. *FEBS Journal* **281**(10):2443-2455.

Corder BN, Bullard BL, Poland GA, Weaver EA. 2020. A decade in review: A systematic review of universal influenza vaccines in clinical trials during the 2010 decade. *Viruses* **12**(10):1186.

Corona A. 2020. A universal influenza vaccine: How close are we? https://www.asm.org/Articles/2019/August/A-Universal-Influenza-Vaccine-How-Close-Are-We

Crane AT, Aravalli RN, Asakura A, Grande AW, Krishna VD, Carlson DF, Cheeran MC, Danczyk G, Dutton JR, Hackett PB, Hu WS, Li L, Lu WC, Miller ZD, O'Brien TD, Panoskaltsis-Mortari A, Parr AM, Pearce C, Ruiz-Estevez M, Shiao M, Sipe CJ, Toman NG, Voth J, Xie H, Steer CJ, Low WC. 2019. Interspecies organogenesis for human transplantation. *Cell Transplantation* **28**(9-10):1091-1105.

Cummins J, Tangney M. 2013. Bacteria and tumours: Causative agents or opportunistic inhabitants?. Infect Agents Cancer 8, 11 (2013). https://doi.org/10.1186/1750-9378-8-11

Curti LA, Primost I, Valla S, Ibañez Alegre D, Olguin Perglione C, Repizo GD, Lara J, Parcerisa I, Palacios A, Llases ME, Rinflerch A, Barrios M, Pereyra Bonnet F, Gimenez CA, Marcone DN. 2021. Evaluation of a lyophilized CRISPR-Cas12 assay for a sensitive, specific, and rapid detection of SARS-CoV-2. *Viruses* **13**(3):420.

Darricarrère N, Pougatcheva S, Duan X, Rudicell RS, Chou TH, DiNapoli J, Ross TM, Alefantis T, Vogel TU, Kleanthous H, Wei CJ, Nabel GJ. 2018. Development of a pan-H1 influenza vaccine. *Journal of Virology* **92**(22):e01349-18.

De Robertis M, Pasquet L, Loiacono L, Bellard E, Messina L, Vaccaro S, Di Pasquale R, Fazio VM, Rols MP, Teissie J, Golzio M, Signori E. 2018. *In vivo* evaluation of a new recombinant hyaluronidase to improve gene electro-transfer protocols for DNA-based drug delivery against cancer. *Cancers* **10**(11):405.

Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 2020. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: Development and challenges. *Nature Reviews* **19**(3):185-199.

van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJ, Bruggeling CE, Schürch AC, van Ham PM, Imhof S, Nijhuis M, Wiertz EJHJ, Lebbink RJ. 2016. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *PLoS Pathogens* **12**(6):e1005701.

Ding X, Yin K, Li Z, Liu C. 2020. All-in-one dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) assay: A case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *Nature Communications* **11**:4711.

Dinos GP. 2017. The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology* **174**(18):2967-2983.

DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. 2016. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* **47**:20-33.

Dlugosz A, Janecka A. 2017. Novobiocin analogs as potential anticancer agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **17**(9):728-733.

Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. 2016. Aminoglycoside resistance: The emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America* **30**(2):523-537.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine* **361**(5):455-467. Erratum in: *New England Journal of Medicine* **361**(17):1714.

Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. 2016. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: History, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* **36**(6):1110-1122.

Enzmann BL, Wronski A. 2019. How CRISPR is accelerating drug discovery. *Genetic Engineering and Biotechnology News* **39**(1).

Fakhiri J, Schneider MA, Puschhof J, Stanifer M, Schildgen V, Holderbach S, Voss Y, El Andari J, Schildgen O, Boulant S, Meister M, Clevers H, Yan Z, Qiu J, Grimm D. 2019. Novel chimeric gene therapy vectors based on adeno-associated virus and four different mammalian bocaviruses. *Molecular Therapy: Methods and Clinical Development* **12**:202-222.

Fang H, Kang J, Zhang D. 2017. Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories* **16**(1):15.

Farkas A, Tarco E, Crăciunaş C, Bocoş B, Butiuc-Keul A. 2017. Screening for phenotypic and genotypic resistance to antibiotics in Gram-positive pathogens. *Studia Universitatis Babes-Bolyai* **62**(2):85-96.

Farkas A, Tarco E, Butiuc-Keul A. 2019. Antibiotic resistance profiling of pathogenic *Enterobacteriaceae* from Cluj-Napoca, Romania. *Germs* **9**(1):17-27.

Farkas H, Varga L. 2011. Ecallantide is a novel treatment for attacks of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* **4**:61-68.

Fayed B, Ashford DA, Hashem AM, Amin MA, El Gazayerly ON, Gregory MA, Smith MCM. 2015. Multiplexed integrating plasmids for engineering of the erythromycin gene cluster for expression in *Streptomyces* spp. and combinatorial biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **81**(24):8402-8413.

Fernandes P, Martens E, Pereira D. 2017. Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics. *Journal of Antibiotics* **70**(5):527-533.

Fernández-Cabezón L, Galán B, García JL. 2018. New insights on steroid biotechnology. *Frontiers in Microbiology* **9**:958.

Fernández-Martínez LT, Borsetto C, Gomez-Escribano JP, Bibb MJ, Al-Bassam MM, Chandra G, Bibb MJ. 2014. New insights into chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**(12):7441-7450.

Finco O, Rappuoli R. 2014. Designing vaccines for the twenty-first century society. *Frontiers in Immunology* **5**:12.

Floss HG, Yu TW. 2005. Rifamycins mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews* **105**(2):621-632.

Folegatti PM, Ewer K, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, Berry L, Bibi S, Bittaye M, Cathie K, Chappell H, Charlton S, Cicconi P, Clutterbuck EA, Colin-Jones R, Dold C, Emary KRW, Fedosyuk S, Fuskova M, Gbesemete D, Green C, Hallis B, Hou MM, Jenkin D, Joe CCD, Kelly EJ, Kerridge S, Lawrie AM, Lelliott A, Lwin MN, Makinson R, Marchevsky NG, Mujadidi Y, Munro APS, Pacurar M, Plested E, Rand J, Rawlinson T, Rhead S, Robinson H, Ritchie AJ, Ross-Russell AL, Saich S, Singh N, Smith CC, Snape MD, Song R, Tarrant R, Themistocleous Y, Thomas KM, Villafana TL, Warren SC, Watson MEE, Douglas AD, Hill AVS, Lambe T, Gilbert SC, Faust SN, Pollard AJ. 2020. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* **396**(10249):467-478.

Foote MA. 2008. Hematopoietic growth factors. În: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology. Fundamentals and applications*. Informa Healthcare, New York. Pp 225-242.

Frank AM, Buchholz CJ. 2019. Surface-engineered lentiviral vectors for selective gene transfer into subtypes of lymphocytes. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* **12**(15):19-31.

Fuoco D. 2012. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. *Antibiotics* **1**(1):1-13.

Gaines R. 2017. The discovery of penicillin-new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases* **23**(5):849-853.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology* **12**(11):1035-1044.

Garcia-Estrada C, Martin JF. 2011. Penicillins and cephalosporins. În: Murray MY. *Comprehensive biotechnology*. Elsevier, Amsterdam. Pp 255-268.

Garg H, Mehmetoglu-Gubuz T, Joshi A. 2020. Virus like particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. *Scientific Reports* **10**(1):4017.

Garrett WS. 2015. Cancer and the microbiota. *Science* **348**(6230):80-86.

Giudice V, Mensitieri F, Izzo V, Filippelli A, Selleri C. 2020. Aptamers and antisense oligonucleotides for diagnosis and treatment of hematological diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(9):3252.

Glass CA. 2018. Recombinant heparin-new opportunities. *Frontiers in Medicine* **5**:341.

Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. 2015. Cancer biomarker discovery and validation. *Translational Cancer Research* **4**(3):256-269.

Gong B, Wu Z, Li Z. 2016. Efficacy and safety of nesiritide in patients with decompensated heart failure: A meta-analysis of randomised trials. *BMJ Open* **6**(1):e008545.

Greer ND. 2006. Tigecycline (Tygacil): The first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proceedings Baylor University Medical Center*. **19**(2):155-161.

Grossman TH. 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **6**(4):a025387

Gulley JL, Borre M, Vogelzang NJ, Ng S, Agarwal N, Parker C, Pook DW, Rathenborg P, Flaig TW, Carles J, Saad F, Shore ND, Chen L, Heery CR, Gerritsen WR, Priou F, Langkilde NC, Novikov A, Kantoff PW. 2019. Phase III trial of PROSTVAC in asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **37**(13):1051-1062.

Gutbier S, Wanke F, Dahm N, Rummelin A, Zimmermann S, Christensen K, Köchl F, Rautanen A, Hatje K, Geering B, Zhang JD, Britschgi M, Cowley SA, Patsch C. 2020. Large-scale

production of human iPSC-derived macrophages for drug screening. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(13):4808.

Hanh BTB, Kim TH, Park JW, Lee DG, Kim JS, Du YE, Yang CS, Oh DC, Jang J. 2020. Etamycin as a novel *Mycobacterium abscessus* inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(18):6908.

Harper A, Vijayakumar V, Ouwehand AC, Ter Haar J, Obis D, Espadaler J, Binda S, Desiraju S, Day R. 2021. Viral infections, the microbiome, and probiotics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**:596166.

Harris DM, Westerlaken I, Schipper D, van der Krogt ZA, Gombert AK, Sutherland J, Raamsdonk LM, van den Berg MA, Bovenberg RA, Pronk JT, Daran JM. 2009. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. *Metabolic Engineering* **11**(2):125-137.

Hashemzadeh A, Avan A, Ferns GA, Khazaei M. 2020. Vaccines based on virus-like nano-particles for use against Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus. *Vaccines* **38**(36):5742-5746.

Hashimoto H, Eto T, Yamamoto M, Yagoto M, Goto M, Kagawa T, Kojima K, Kawai K, Akimoto T, Takahashi RI. 2019. Development of blastocyst complementation technology without contributions to gametes and the brain. *Experimental Animals* **68**(3):361-370.

Haslinger K, Peschke M, Brieke C, Maximowitsch E, Cryle MJ. 2015. X-domain of peptide synthetases recruits oxygenases crucial for glycopeptide biosynthesis. *Nature* **521**(7550):105-109.

Heidary F, Gharebaghi R. 2020. Ivermectin: A systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. *The Journal of Antibiotics* **73**(9):593-602.

Hu Y, Zhu B. 2016. Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer. *Synthetic and Systems Biotechnology* **1**(3):143-149.

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. 2011. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* **162**(6):1239-1249.

Hugues JN, Durnerin IC. 2011. Gonadotrophins - filled-by-mass versus filled-by-bioassay. *RBM Online* **10**(3):11-17.

Ibrahim AA, El-Housseiny GS, Aboshanab KM, Yassein MA, Hassouna NA. 2019. Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: Statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens. *BMC Microbiology* **19**(1):18.

Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. 2020a. The promise of mRNA vaccines: A biotech and industrial perspective. *npj Vaccines* **5**(1):11.

Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, McCullough MP, Chappell JD, Denison MR, Stevens LJ, Pruijssers AJ, McDermott A, Flach B, Doria-Rose NA, Corbett KS, Morabito KM, O'Dell S, Schmidt SD, Swanson PA 2nd, Padilla M, Mascola JR, Neuzil KM, Bennett H, Sun W, Peters E, Makowski M, Albert J, Cross K,

Buchanan W, Pikaart-Tautges R, Ledgerwood JE, Graham BS, Beigel JH. 2020b. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary report. *New England Journal of Medicine* **383**(20):1920-1931.

Jaglic Z, Cervinkova D. 2012. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: A review. *Veterinarni Medicina* **57**(6):275-281.

James TC .2016. IPR issues related to medicinal and aromatic plants (herbs & their allied products). *Journal of Traditional and Folk Practices* **02, 03, 04**(1):7-17.

Jamrozy DM, Coldham NG, Butaye P, Fielder MD. 2014. Identification of a novel plasmid-associated spectinomycin adenyltransferase gene spd in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animal and human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**(5):1193-1196.

Janata J, Kadlcik S, Koberska M, Ulanova D, Kamenik Z, Novak P, Kopecky J, Novotna J, Radojevic B, Plhackova K, Gazak R, Najmanova L. 2015. Lincosamide synthetase-a unique condensation system combining elements of nonribosomal peptide synthetase and mycothiol metabolism. *PLoS ONE* **10**(3):e0118850.

Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, Zhang B, Li X, Zhang L, Peng C, Duan Y, Yu J, Wang L, Yang K, Liu F, Jiang R, Yang X, You T, Liu X, Yang X, Bai F, Liu H, Liu X, Guddat LW, Xu W, Xiao G, Qin C, Shi Z, Jiang H, Rao Z, Yang H. 2020. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**(7811):289-293.

Jozala AF, Geraldes DC, Tundisi LL, de Araujo Feitosa V, Breyer CA, Cardoso SL, Mazzola PG, Oliveira-Nascimento L, Rangel-Yagui CO, Magalhães PO, Oliveira MA, Pessoa A Jr. 2016. Biopharmaceuticals from microorganisms: From production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**(S1):51-63.

Kampfer P. 2012. Genus *Streptomyces*. În: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, WhitmanWB. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 5, *Actinobacteria*. Part A. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. Pp 1455-1767.

Kar T, Narsaria U, Basak S, Deb D, Castiglione F, Mueller DM, Srivastava AP. 2020. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Scientific Reports* **10**(1):10895.

Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. 2019. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols* **14**(10):2986-3012.

Khambhati K, Gargi B, Nisarg G, Darren B, Vishwesh K, Vijai S. 2019. Exploring the potential of cell-free protein synthesis for extending the abilities of biological systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **7**:248.

Khamis F, Al-Zakwani I, Al Hashmi S, Al Dowaiki S, Al Bahrani M, Pandak N, Al Khalili H, Memish Z. 2020. Therapeutic plasma exchange in adults with severe COVID-19 infection. *International Journal of Infectious Diseases* **99**:214-218.

Kharel MK, Subba B, Basnet DB, Woo JS, Lee HC, Liou K, Sohng JK. 2004. A gene cluster for biosynthesis of kanamycin from *Streptomyces kanamyceticus*: Comparison with gentamicin biosynthetic gene cluster. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **429**(2):204-214.

Kim DW, Thawng CN, Lee K, Wellington EMH. 2019. A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavindependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. *Environment International* **127**:206-215.

Kim IK. 2020. RNA therapy: Current status and future potential. *Chonnam Medical Journal* **56**(2):87-93.

Kittendorf JD, Sherman DH. 2009. The methymycin/pikromycin pathway: A model for metabolic diversity in natural product biosynthesis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**(6):2137-2146.

Kosmas CE, Estrella AM, Sourlas A, Silverio D, Hilario E, Montan PD, Guzman E. 2018. Inclisiran: A new promising agent in the management of hypercholesterolemia. *Diseases* **6**(3):63.

Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **6**(6):a027029.

Kumar S, Sunagar R, Gosselin E. 2019. Bacterial protein toll-like-receptor agonists: A novel perspective on vaccine adjuvants. *Frontiers in Immunology* **10**:1144.

Kundu S, Chakravarty I, Ojha S, Kundu K. 2019. Design and development of antibiotic fermentation using different processing strategies: Challenges and perspectives. În: Shukla P. *Applied microbiology and bioengineering*. Academic Press. Elsevier. Pp. 163-183

Kumagai T, Koyama Y, Oda K, Noda M, Matoba Y, Sugiyama M. 2010 Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for the antitubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**(3):1132-1139.

Kumru OS, Joshi SB, Smith DE, Middaugh CR, Prusik T, Volkin DB. 2014. Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals* **42**(5):237-259.

Laimbacher AS, Esteban LE, Castello AA, Abdusetir Cerfoglio JC, Argüelles MH, Glikmann G, D'Antuono A, Mattion N, Berois M, Arbiza J, Hilbe M, Schraner EM, Seyffert M, Dresch C, Epstein AL, Ackermann M, Fraefel C. 2012. HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Molecular Therapy* **20**(9):1810-1820.

Laing R, Gillan V, Devaney E. 2017. Ivermectin - old drug, new tricks? *Trends in Parasitology* **33**(6):463-472.

Lebreton F, Cattoir V. 2019. Resistance to glycopeptide antibiotics. În: Bonev BB, Brown NM. *Bacterial resistance to antibiotics – from molecules to man*. John Wiley & Sons. Pp. 51–80.

Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Antimicrobial Resistance* **34**(4):482-492.

Lee YR, Burton CE. 2019. Eravacycline, a newly approved fluorocycline. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **38**(10):1787-1794.

Leucuţa SE. 2007. *Tehnologie farmaceutică industrială*, Editura Dacia, Cluj-Napoca.

Leucuţa SE. 2011. *Planuri experimentale şi optimizarea formulării medicamentelor*. Editura Risoprint, Cluj-Napoca.

Lexchin J. 2018. Pharmaceutical company spending on research and development and promotion in Canada, 2013-2016: A cohort analysis. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice* **11**:5.

Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. 2020. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: Mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **5**:1.

Limbana T, Khan F, Eskander N. 2020. Gut microbiome and depression: How microbes affect the way we think. *Cureus* **12**(8):e9966.

Lin CY, Pang AP, Zhang Y, Qiao J, Zhao GR. 2020. Comparative transcriptomic analysis reveals the signifcant pleiotropic regulatory effects of *LmbU* on lincomycin biosynthesis. *Microbial Cell Factories* **19**(1):30.

Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**(7535):455-459.

Liras P, Martin JF. 2006. Gene clusters for β-lactam antibiotics and control of their expression: Why have clusters evolved, and from where did they originate? *International Microbiology* **9**(1):9-19.

Lu Y, Xue J, Deng T, Zhou X, Yu K, Deng L, Huang M, Yi X, Liang M, Wang Y, Shen H, Tong R, Wang W, Li L, Song J, Li J, Su X, Ding Z, Gong Y, Zhu J, Wang Y, Zou B, Zhang Y, Li Y, Zhou L, Liu Y, Yu M, Wang Y, Zhang X, Yin L, Xia X, Zeng Y, Zhou Q, Ying B, Chen C, Wei Y, Li W, Mok T. 2020. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine* **26**(5):732-740.

Lundstrom K. 2018. Viral vectors in gene therapy. *Diseases* **6**(2):42.

Lundstrom K. 2019. RNA viruses as tools in gene therapy and vaccine development. *Genes* **10**(3):189.

Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK. 2019. The development of gonadotropins for clinical use in the treatment of infertility. *Frontiers in Endocrinology* **10**:429.

Luo H, Li Q, Yu H, Shen Z. 2004. Construction and application of fusion proteins of D-amino acid oxidase and glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase for direct bioconversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnology Letters* **26**(11):939-945.

Macfarlane G. 1984. *Alexander Fleming: The man and the myth*. Harvard University Press, Cambridge MA.

Malek AE, Granwehr BP, Kotoyiannis DP. 2020. Doxycycline as a potential partner of COVID-19 therapies. *ID Cases* **21**:e00864.

Malhotra V, Perry MC. 2003. Classical chemotherapy. Mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biology and Therapy* **2-4**(1):S2-S4.

Manzoni M, Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(5):555-564.

Marlow G, van Gent D, Ferguson LR. 2013. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World Journal of Gastroenterology* **19**(25):3931-3941.

Martens JH, Barg J, Warren MJ, Jahn D. 2002. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(3):275-285.

Martin JF, Casqueiro J, Kosalkova K, Marcos AT, Gutierrez S. 1999. Penicillin and cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**(1-2):21-31.

Martín JF, Ullán RV, García-Estrada C. 2010. Regulation and compartmentalization of β-lactam biosynthesis. *Microbial Biotechnology* **3**(3):285-299.

Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Neuzil K, Raabe V, Bailey R, Swanson KA, Li P, Koury K, Kalina W, Cooper D, Fontes-Garfias C, Shi PY, Türeci Ö, Tompkins KR, Walsh EE, Frenck R, Falsey AR, Dormitzer PR, Gruber WC, Şahin U, Jansen KU. 2020. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* **586**(7830):589-593.

Masignani V, Pizza M, Moxon ER. 2019. The development of a vaccine against meningococcus B using reverse vaccinology. *Frontiers in Immunology* **10**:751.

Mast Y, Wohlleben W. 2013. Streptogramins - two are better than one! *International Journal of Medical Microbiology* **304**(1):44-50.

Mast Y, Guezguez J, Handel F, Schinko E. 2015. A complex signalling cascade governs pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis. Applied and Environmental Microbiology* **81**(19):6621-6636.

Meijer WH, Gidijala L, Fekken S, Kiel JAKW, van den Berg MA, Lascaris R, Bovenberg RAL, van der Klei IJ. 2010. Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(17):5702-5709.

Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, Boye SL, Boye SE, George LA, Salabarria S, Corti M, Byrne BJ, Tremblay JP. 2021. Current clinical applications of *in vivo* gene therapy with AAVs. *Molecular Therapy* **29**(2):464-488.

Merola J, Reschke M, Pierce RW, Qin L, Spindler S, Baltazar T, Manes TD, Lopez-Giraldez F, Li G, Bracaglia LG, Xie C, Kirkiles-Smith N, Saltzman WM, Tietjen GT, Tellides G, Pober JS. 2019. Progenitor-derived human endothelial cells evade alloimmunity by CRISPR/Cas9-mediated complete ablation of MHC expression. *JCI Insights* **4**(20):e129739.

Metsky HC, Freije CA, Kosoko-Thoroddsen T-SF, Sabeti PC, Myhrvold C 2020. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. *bioRxiv* doi:10.1101/2020.02.26.967026.

Miller ES, Woese CR, Brenner S. 1991. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**(3):363-368.

Miller WR, Bayer AS, Arias CA. 2016. Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **6**(11):a026997.

Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Madhavi F, Badrzadeh F, Kazemi S, Ebrahimi M, Soltani F, Kazemi S, Jeda AS, Darvishmotevalli M, Yousefimashouf R, Keyvani H, Karampoor S. 2020. Overview of the current promising approaches for the development of an effective severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine. *International Immunopharmacology* **88**:106928.

Modi NB. 2008. Recombinant coagulation factors and thrombolytic agents. În: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology*. *Fundamentals and applications*. Informa Healthcare, New York. Pp 293-308.

Moehler M, Heo J, Lee HC, Chao Y, Paik SW, Yim HJ, Byun KS, Baron A, Ungerechts G, Jonker D, Ruo L, Cho M, Kaubisch A, Wege H, Merle P, Ebert O, Habersetzer F, Blanc JF, Rosmorduc O, Lencioni R, Patt R, Leen AM, Foerster F, Homerin M, Stojkowitz N, Lusky M, Limacher JM, Hennequi M, Gaspar N, McFadden B, De Silva N, Shen D, Pelusio A, Kirn DH, Breitbach CJ, Burke JM. 2019. Vaccinia-based oncolytic immunotherapy Pexastimogene Devacirepvec in patients with advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib failure: A randomized multicenter Phase IIb trial (TRAVERSE). *Oncoimmunology* **8**(8):e1615817.

Moore MJ, Qu S, Tan C, Cai Y, Mogi Y, Keith DJ, Boger DL. 2020. Next-generation total synthesis of vancomycin. *Journal of the American Chemical Society* **142**(37):16039-16050.

Morrison M. 2019. Making cells worthwhile: Calculations of value in a European consortium for induced pluripotent stem cell banking. *Science as Culture* **28**(1):46-69.

Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Neuzil K, Raabe V, Bailey R, Swanson KA, Li P, Koury K, Kalina W, Cooper D, Fontes-Garfias C, Shi PY, Türeci Ö, Tompkins KR, Walsh EE, Frenck R, Falsey AR, Dormitzer PR, Gruber WC, Şahin U, Jansen KU. 2020. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* **586**(7830):589-593.

Muntean V. 2013. Microbiologie industrială. *Presa Universitară Clujeană*, Cluj-Napoca.

Murin CD, Wilson IA, Ward AB. 2019. Antibody responses to viral infections: A structural perspective across three different enveloped viruses. *Nature Microbiology* **4**(5):737-747.

Murray PE. 2007. *Patenting traditional medicine*. Nomos, Baden-Baden.

Musiol-Kroll EM, Wohlleben W 2018. Acyltransferases as tools for polyketide synthase engineering. *Antibiotics* **7**:62.

Müller C, Nolden S, Gebhardt P, Heinzelmann E, Lange C, Puk O, Welzel K, Wohlleben W, Schwartz D. 2007. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the

lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(3):1028-1037.

Naseri Z, Khezri G, Davarpanah SJ, Ofoghi H. 2019. Virus-based vectors: A new approach for the production of recombinant proteins. *Journal of Applied Biotechnology Reports* **6**(1):6-14.

Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **83**(3):770-803.

Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP. 2020. Virus against virus: A potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. *Cell Research* **30**(3):189-190.

Niraula NP, Kim SH, Sohng JK, Kim ES. 2010. Biotechnological doxorubicin production: Pathway and regulation engineering of strains for enhanced production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(4):1187-1194.

Novotna J, Olsovska J, Novak P, Mojzes P, Chaloupkova R, Kamenik Z, Spizek J, Kutejova E, Mareckova M, Tichy P, Damborsky J, Janata J. 2013. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS ONE* **8**(12):e79974.

Oblak M, Kotnik M, Solmajer T. 2007. Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Current Medicinal Chemistry* **14**(19):2033-2047.

Oguamanam C. 2008. Patents and traditional medicine: Digital capture, creative legal interventions, and the dialectics of knowledge transformation. *Indiana Journal of Global Legal Studies* **15**(2):489-528.

Oprea TI, Bologa CG, Brunak S, Campbell A, Gan GN, Gaulton A, Gomez SM, Guha R, Hersey A, Holmes J, Jadhav A, Jensen LJ, Johnson GL, Karlson A, Leach AR, Ma'ayan A, Malovannaya A, Mani S, Mathias SL, McManus MT, Meehan TF, von Mering C, Muthas D, Nguyen DT, Overington JP, Papadatos G, Qin J, Reich C, Roth BL, Schürer SC, Simeonov A, Sklar LA, Southall N, Tomita S, Tudose I, Ursu O, Vidovic D, Waller A, Westergaard D, Yang JJ, Zahoránszky-Köhalmi G. 2018. Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**(5):317-332.

Ordóñez-Robles M, Santos-Beneit F, Martín JF. 2018. Unraveling nutritional regulation of tacrolimus biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic approaches. *Antibiotics* **7**(2):39.

Owczarek B, Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K. 2019. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *Biomed Research International* **2019**:4216060.

Paddon CJ, Keasling JD. 2014. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews Microbiology* **12**(5):355-367.

Paljetak HC, Verbanac D, Padovan J, Dominis-Kramarić M, Kelnerić Z, Perić M, Banjanac M, Ergović G, Simon N, Broskey J, Holmes DJ, Eraković Haber V. 2016. Macrolones are a novel class of macrolide antibiotics active against key resistant respiratory pathogens *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**(9):5337-5348.

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. 2018. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nature Reviews* **17**(4):261-279.

Park K. 2019. A review of computational drug repurposing. *Translational and Clinical Pharmacology* **27**(2):59-63.

Park SR, Yoo YJ, Ban YH, Yoon YJ. 2010. Biosynthesis of rapamycin and its regulation: Past achievements and recent progress. *The Journal of Antibiotics* **63**(8):434-441.

Paukner S, Riedl R. 2017. Pleuromutilins: Potent drugs for resistant bugs-mode of action and resistance. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine* **7**(1):a027110.

Paz MM, Zhang X, Lu J, Holmgren A. 2012. A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: Mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. *Chemical Research in Toxicology* **25**(7):1502-1511.

Pickens LB, Tang Y. 2009. Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. *Metabolic Engineering 11*(2):69-75.

Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Ścibisz I. 2018. *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**(2):515-538.

Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. 2016. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**(1):e1115641.

Popovici I, Lupuleasa D. 2001-2009. *Tehnologie farmaceutică*, Editura Polirom, Iaşi.

Pulendran B, Arunachalam PS, O'Hagan DT. 2021. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery* **20**(6):454-475.

Pyeon H, Nah H, Kang SH, Choi SS, Kim ES. 2017. Heterologous expression of pikromycin biosynthetic gene cluster using *Streptomyces* artificial chromosome system. *Microbial Cell Factories* **16**(1):96.

Quan FS, Basak S, Chu KB, Kim SS, Kang SM. 2020. Progress in the development of virus-like particle vaccines against respiratory viruses. *Expert Review of Vaccines* **19**(1):11-24.

Ramamoorth M, Navekar A. 2015. Non-viral vectors in gene therapy- An overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**(1):GE01-GE06.

Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* **13**(6):151-171.

Razavi M, Marathe NP, Gillings MR, Flach CF, Kristiansson E, Joakim Larsson DG. 2017. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome* **5**(1):160.

Reynolds TD, Buonocore L, Rose NF, Robek MD. 2015. Virus-like vesicle-based therapeutic vaccine vectors for chronic Hepatitis B virus infection. *Journal of Virology* **89**(20):10407-10415.

Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shresta S, Pierson TC, Ciaramella G, Diamond MS. 2017. Modified -mRNA vaccines protect against Zika Virus infection. *Cell* **168**(6):1114-1125.

Riedl M. 2015. Recombinant human C1 esterase inhibitor in the management of hereditary angioedema. *Clinical Drug Investigation* **35**(7):407-417.

Rittié L, Perbal B. 2008. Enzymes used in molecular biology: A useful guide. *Journal of Cell Communication and Signalling* **2**(1-2):25-45.

Rodriguez-Saiz M, De La Fuente JL, Barredo JL. 2010. Cephalosporin production by fungal metabolic engineering. În: Flickinger MC. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. John Wiley & Sons, Inc.

Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* **5**:172.

Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, McCague S, Cross D, Marshall KA, Walshire J, Kehoe TL, Reichert H, Davis M, Raffini L, George LA, Hudson FP, Dingfield L, Zhu X, Haller JA, Sohn EH, Mahajan VB, Pfeifer W, Weckmann M, Johnson C, Gewaily D, Drack A, Stone E, Wachtel K, Simonelli F, Leroy BP, Wright JF, High KA, Maguire AM. 2017. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* **390**(10097):849-860.

Ryff JC, Bordens RW, Pestka S. 2008. Interferons and interleukins. În: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology. Fundamentals and applications*. Informa Healthcare, New York. Pp 243-264.

Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, deGroot AM, Stoop J, Tete S, Van Damme W, Leroux-Roels I, Berghmans PJ, Kimmel M, Van Damme P, de Hoon J, Smith W, Stephenson KE, De Rosa SC, Cohen KW, McElrath MJ, Cormier E, Scheper G, Barouch DH, Hendriks J, Struyf F, Douoguih M, Van Hoof J, Schuitemaker H. 2021. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* NEJMoa2034201.

Sambyal K, Singh RV. 2020. Bioprocess and genetic engineering aspects of ascomycin production: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **18**(1):73.

Sanghvi GV, Ghevariya D, Gosai S, Langa R, Dhaduk N, Kunjadia PD, Vaishnav DJ, Dave GS. 2014. Isolation and partial purification of erythromycin from alkaliphilic *Streptomyces werraensis* isolated from Rajkot, India. *Biotechnology Reports* **1-2**:2-7.

Scannell JW, Blanckley A, Boldon H, Warrington B. 2012. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**(3):191-200.

Schwechheimer SK, Park EY, Revuelta JL, Becker J, Wittmann C. 2016. Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**(5):2107-2119.

Scott A. 2018. How CRISPR is transforming drug discovery. *Nature* **555**(7695):S10-S11.

Seder RA, Chang LJ, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, Holman LA, James ER, Billingsley PF, Gunasekera A, Richman A, Chakravarty S, Manoj A, Velmurugan S, Li M, Ruben AJ, Li T, Eappen AG, Stafford RE, Plummer SH, Hendel CS, Novik L, Costner PJ, Mendoza FH, Saunders JG, Nason MC, Richardson JH, Murphy J, Davidson SA, Richie TL,

Sedegah M, Sutamihardja A, Fahle GA, Lyke KE, Laurens MB, Roederer M, Tewari K, Epstein JE, Sim BK, Ledgerwood JE, Graham BS, Hoffman SL. 2013. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* **341**(6152):1359-1365.

Shanmuragaj B, Bulaon CJI, Phoolcharoen W. 2020. Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants* **9**(7):842.

Sheehan J, Marasco VA. 2015. Phage and yeast display. *Microbiology Spectrum* **3**(1):AID-0028-2014.

Spížek J, Řezanka T. 2016. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology* **133**:20-28.

Steinmetz KL, Spack EG. 2009. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurology* **9**(I):S2.

Steffensky M, Mühlenweg A, Wang ZX, Li SM, Heide L. 2000. Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(5):1214-1222.

Sun C, Hunt DK, Clark RB, Lofland D, O'Brien WJ, Plamondon L, Xiao XY. 2011. Synthesis and antibacterial activity of pentacyclines: A novel class of tetracycline analogs. *Journal of Medical Chemistry* **54**(11):3704-3731.

Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. 2017. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **13**(12):2837-2848.

Szekeres E, Baricz A, Chiriac CM, Farkas A, Opriş O, Soran ML, Andrei AS, Rudi K, Balcazar JL, Dragoş N, Coman C. 2017. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environmental Pollution* **225**:304-315.

Tahamtan A, Charostad J, Shokouh SJH, Barati M. 2017. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine* **5**(3):e12315.

Tambadou F, Caradec T, Gagez AL, Bonnet A, Sopena V, Bridiau N, Thiéry V, Didelot S, Barthélémy C, Chevrot R. 2015. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster. *Archives of Microbiology* **197**(4):521-532.

Taunt HN, Stoffels L, Purton S. 2017. Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered* **9**(1):48-54.

Thaker MN, Wang W, Spanogiannopoulos P, Waglechner N, King AM, Medina R, Wright GD. 2013. Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nature Biotechnology* **31**(10):922-927.

Thapa LP, Oh TJ, Liou K, Song JK. 2008. Biosynthesis of spectinomycin: Heterologous production of spectinomycin and spectinamine in an aminoglycoside-deficient host, *Streptomyces venezuelae* YJ003. *Journal of Applied Microbiology* **105**(1):300-308.

The European Pharmacopoeia Commission. Live biotherapeutic products for human use 9.7 (2019).

Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, Spencer J. 2019. β-lactamases and β-lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of Molecular Biology* **431**(18):3472-3500.

Tripathi NK, Shrivastava A. 2019. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: Expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **7**:420.

Trovato M, Sartorius R, D'Apice L, Manco R, De Berardinis P. 2020. Viral emerging diseases: challenges in developing vaccination strategies. *Frontiers in Immunology* **11**:2130.

Tsuruta LR, Lopes dos M, Moro AM. 2018. Display technologies for the selection of monoclonal antibodies for clinical use. În: Boldicke T. *Antibody engineering*. Intech Open Science. Pp 47-73.

Tucaliuc A, Postaru M, Cascaval D, Galaction AI. 2019. 7-Aminocephalosporanic acid - production and separation. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **64**(2):87-99.

Uddin F, Rudin CM, Sen T. 2020. CRISPR gene therapy: Applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology* **10**:1387.

Ungerechts G, Bossow S, Leuchs B, Holm PS, Rommelaere J, Coffey M, Coffin R, Bell J, Nettelbeck DM. 2018. Moving oncolytic viruses into the clinic: Clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **3**:16018.

Unwin J, Standage S, Alexander D, Hosted T Jr, Horan AC, Wellington EM. 2004. Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex. *Journal of Antibiotics* **57**(7):436-445.

Urb M, Sheppard DC. 2012. The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathogens* **8**(4):e1002619.

Ursu O, Glick M, Oprea T. 2019. Novel drug targets in 2018. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**:328

Van Regenmortel MHV. 2008. Antigenicity and immunogenicity of viral proteins. În Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. *Encyclopedia of virology*, Elsevier LTD. Pp. 137-142.

Van Riel D, de Wit E. 2020. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature Materials* **19**(8):810-812.

van Wageningen AMA, Kirkpatrick PN, Williams DH, Harris BR, Kershaw JK, Lennard NJ, Jones M, Jones SJ, Solenberg PJ. 1998. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chemistry and Biology* **5**(3):155-162.

van Zyl DG, Mautner J, Delecluse HJ. 2019. Progress in EBV vaccines. *Frontiers in Oncology* **9**:104.

Vargason AM, Anselmo AC, Mitragotri S. 2021. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nature Biomedical Engineering* doi:10.1038/s41551-021-00698-w.

Velasco J, Adrio JL, Moreno MA, Diez B, Soler G, Barredo JL. 2000. Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. *Nature Biotechnology* **18**(8):857-861.

von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Habich D. 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? *Angewandte Chemie International Edition* **45**(31):5072-5129.

Walsh G. 2007. *Pharmaceutical biotechnology. Concepts and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Walsh G. 2018. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology* **36**(12):1136-1147.

Wang J, Pan Y, Shen J, Xu Y. 2017. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **16**(1):24.

Ward BJ, Makarkov A, Séguin A, Pillet S, Trépanier S, Dhaliwall J, Libman MD, Vesikari T, Landry N. 2020. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥65 years): Two multicentre, randomised phase 3 trials. *The Lancet*. **396**(10261):1491-1503.

Ward OP. 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* **30**(5):1119-1139.

Wehmeier UF, Piepersberg W. 2009. Enzymology of aminoglycoside biosynthesis-deduction from gene clusters. *Methods in Enzymology* **459**:459-491.

Wilson DN. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology* **12**(1):35-48.

Winstel R, Wieland J, Gertz B, Mueller A, Allgaier H. 2017. Manufacturing of recombinant human follicle-stimulating hormone Ovaleap (XM17), comparability with Gonal-f, and performance/consistency. *Drugs Research and Development* **17**(2):305-312.

Xia W, Chen W, Peng W, Li K. 2015. Industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. *Bioprocesses and Biosystems Engineering* **38**(6):1065-1073.

Xiao Y, Li S, Niu S, Ma L, Zhang G, Zhang H, Zhang G, Ju J, Zhang C. 2011. Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase. *Journal of the American Chemical Society* **133**(4):1092-105.

Xu J, Wan E, Kim CJ, Floss H, Mahmud T. 2005. Identification of tailoring genes involved in the modification of the polyketide backbone of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Microbiology* **151**(Pt 8):2515-2528.

Yan N, Fan C, Chen Y, Hu Z. 2016. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(6):962.

Yarovinski TO, Mason SW, Menon M, Krady MM, Haslip M, Madina BR, Ma X, Moshkani S, Chiale C, Pal AC, Almassian B, Rose JK, Robek MD, Nakaar V. 2019. Virus-like vesicles

expressing multiple antigens for immunotherapy of chronic Hepatitis B. *iScience* **21**:391-402.

Yee CM, Zak AJ, Hill BD, Wen F. 2018 The coming age of insect cells for manufacturing and development of protein therapeutics. *Industrial Engineering and Chemical Research* **57**(31):10061-10070.

Yim G, Thaker M, Koteva K, Wright G. 2014. Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Journal of Antibiotics* **67**(1):31-41.

Yoon YJ, Kim ES, Hwang YS, Choi CY. 2004. Avermectin: Biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(6):626-634.

Yu Y, Zhang Q, Deng Z. 2017. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. *F1000Research* **6**:723.

Zahnd C, Amstutz P, Pluckthun A. 2007. Ribosome display: Selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nature Methods* **4**(3):269-279.

Zarnea G, Popescu OV. 2011. *Dicţionar de microbiologie generală şi biologie moleculară*. Editura Academiei Române, Bucureşti.

Zeng Q, Qiu F, Yuan L. 2008. Production of artemisinin by genetically-modified microbes. *Biotechnology Letters* **30**(4):581-592.

Zhang H, Wang Y, Wu J, Skalina K, Pfeifer BA. 2010. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chemistry and Biology* **17**(11):1232-1240.

Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, Xu X, Zhang MJ, Chandler LA, Lin H, Hu A, Xu W, Lam DM. 2018. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. *Human Gene Therapy* **29**(2):160-179.

Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K. 2021. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet* **21**(2):181-192.

Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M, Schilling NA, Slavetinsky C. 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535** (7613):511-516.

OUG 152/1999 privind produsele medicamentoase de uz uman. Guvernul României.

Legea 336/2002 pentru aprobarea Ordonanţei de urgenta a Guvernului nr. 152/1999 privind produsele medicamentoase de uz uman. Parlamentul României.

https://www.anm.ro

https://apps.who.int

www.clinicalstudyresults.org

www.clinicaltrials.gov

https://www.ema.europa.eu

https://eudract.ema.europa.eu/

https://www.historyofvaccines.org

www.ISRCTN.org

http://www.nature.com

http://www.orpha.net

www.trialregister.nl

https://www.sartorius.com

www.statista.com

https://www.uspto.gov

http://www.who.int

https://www.wipo.int



ISBN: 978-606-37-1276-0